



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE,  
FISIOLOGICHE E DELLO SPORT  
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMEDICHE PER LA SALUTE  
CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE MORFOLOGICHE  
XXVIII CICLO

**EFFETTO DI CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE  
IN COLTURE CORGANOTIPICHE DI CUTE UMANA  
NORMALE: ANALISI STRUTTURALE E  
ULTRASTRUTTURALE**

BIO/16

Tutor: Prof.ssa Elena Bianca Donetti

Coordinatore: Prof.ssa Chiarella Sforza

Dott.ssa Laura Brigida Cornaghi

Matricola: R10002

Anno Accademico 2014-2015

# INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
<i>Anatomia della cute .....</i>	<i>5</i>
<i>Il citoscheletro.....</i>	<i>9</i>
<i>Adesione intercellulare .....</i>	<i>11</i>
<i>Citotipi epidermici .....</i>	<i>14</i>
<i>La psoriasi.....</i>	<i>16</i>
<i>Psoriasi e citochine pro-infiammatorie .....</i>	<i>19</i>
<i>Terapia della psoriasi .....</i>	<i>22</i>
<i>Modelli sperimentali .....</i>	<i>25</i>
<b>SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>27</b>
<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>28</b>
<i>Colture organotipiche ed esposizione a citochine pro-infiammatorie .....</i>	<i>28</i>
<i>Allestimento dei campioni per l'analisi isto-morfologica .....</i>	<i>30</i>
<i>Analisi quantitativa della proliferazione cellulare .....</i>	<i>39</i>
<i>Analisi qualitativa di markers epidermici in immunofluorescenza .....</i>	<i>41</i>
<i>Analisi quantitativa delle cellule di Langerhans .....</i>	<i>43</i>
<i>Processazione dei campioni per l'analisi ultrastrutturale .....</i>	<i>44</i>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>45</b>
<i>Analisi istologica.....</i>	<i>45</i>
<i>Proliferazione cellulare .....</i>	<i>47</i>
<i>Analisi qualitativa di markers epidermici in immunofluorescenza .....</i>	<i>49</i>
<i>Analisi quantitativa delle cellule di Langerhans .....</i>	<i>58</i>
<i>Analisi ultrastrutturale epidermica.....</i>	<i>60</i>
<i>Analisi ultrastrutturale delle cellule di Langerhans.....</i>	<i>62</i>
<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>68</b>
<b>RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>78</b>

## ABSTRACT

Psoriasis has recently been defined as “a T-cell mediated inflammatory skin disease with T helper cell type 1 (Th1), type 17 (Th17) and IL-22-producing CD4<sup>+</sup> T cells as principal mediators”. The interplay between pro-inflammatory cytokines such as Tumour Necrosis Factor (TNF)-alpha, interleukin (IL)-17 and IL-22 and the two main epidermal cytotypes, i.e. keratinocytes and Langerhans cells, is a central issue in the pathogenesis of psoriasis. The aim of our study was to evaluate the early, direct, and specific effect of TNF-alpha, IL-17 and IL-22 alone or in combination by immunofluorescence on keratinocyte proliferation, keratin (K) 10, 14 and 17 expression, the molecular composition of intercellular junctions (desmocollin 1, E-cadherin, occludin and filaggrin), number of epidermal Langerhans cells. Transmission electron microscopy (TEM) was used to analyse the fine structure of the skin. An innovative model of human skin culture standardized in our laboratory, in which a psoriatic microenvironment was reproduced, was used. Skin explants were obtained from plastic surgery of healthy 20-40 year-old women (n = 7) after informed consent. Bioptic fragments were divided before adding TNF-alpha or IL-17 or IL-22 or a combination of the three cytokines (Triple), and harvested 24, 48, and 72 hours after cytokine incubation. Interestingly, keratinocyte proliferation was inhibited after exposure to TNF-alpha, IL-17 and the combination of cytokines while this parameter was not affected by IL-22 incubation. In all experimental groups, starting from 24 hours, occludin immunostaining was not homogeneously distributed. K10 immunostaining gradually decreased in scattered clusters in the spinous layer only after exposure to IL-22 or to a combination of the three cytokines. K14 staining became widely discontinuous with both IL-22 and the triple, starting from 48 hours. K17 expression was induced and progressively increased with time in the suprabasal layers of epidermis in all experimental groups, except TNF-alpha group. No differences were found in the expression of desmocollin 1 and the distribution of E-cadherin, at any time point. By immunofluorescence analysis with anti-human Langerin antibody we calculated the percentage of Langerhans cells/mm<sup>2</sup> of living epidermis after 24 and 48 hours of incubation (considering control as 100%). At 24 hours Langerhans cells number was significantly higher in samples treated with a combination of IL-17 and TNF-alpha (216.71 + 15.10%; p < 0.001) and in TNF-alpha (125.74 + 26.24%; p < 0.05). No differences were observed in IL-17- treated samples (100.14 + 38.42%). After 48 hours, the number of epidermal Langerin-positive cells in IL-17- and TNF-alpha treated samples slightly decreased (94.99 + 36.79 % and 101.37 + 23% vs. their controls, respectively). With the

combination of IL-17 and TNF-alpha epidermal Langerhans cells strongly decreased (120 +13.36%).

At ultrastructural level, after IL-22 incubation we observed keratin aggregates in the perinuclear cytoplasm of cells, while the combination of the three cytokines induced an enlargement of intercellular spaces. By TEM, upon TNF-alpha stimulus, Langerhans cells appeared with few organelles, mostly mitochondria, lysosomes, and scattered peripheral Birbeck granules. Upon IL-17 stimulus, Langerhans cells showed a cytoplasm with many mitochondria and numerous Birbeck granules close to the perinuclear space and Golgi apparatus, but also at the periphery, at the beginning of the dendrites. The addition of a combination of IL-17 and TNF-alpha did not affect Langerhans cells ultrastructure.

Altogether, our results support the hypothesis that a synergistic effect exists among the pro-inflammatory cytokines of psoriasis and that they interplay with each other in the microenvironment of the psoriatic plaque, with consequent amplification of the effect of each cytokine.

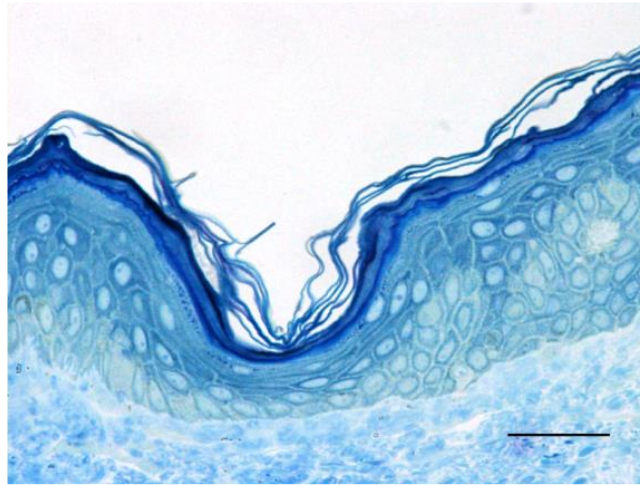
# INTRODUZIONE

## *Anatomia della cute*

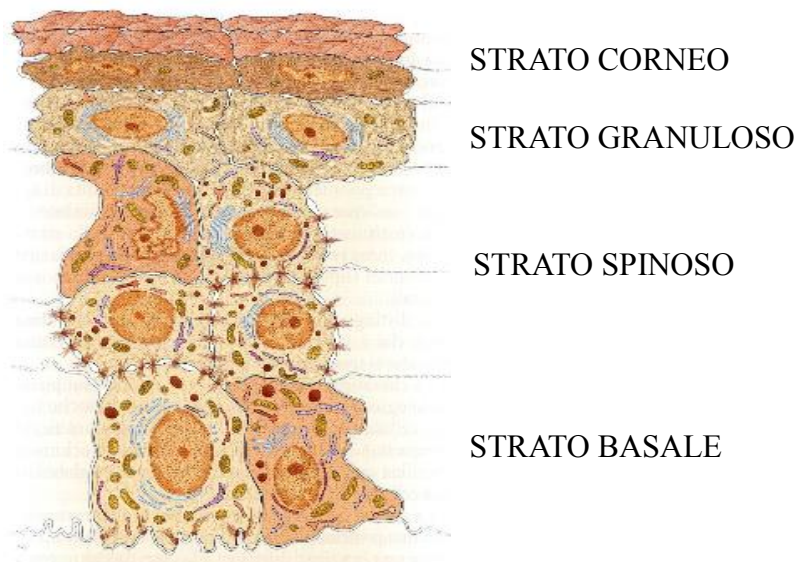
La cute è una struttura anatomica che ricopre tutta la superficie esterna del corpo e si continua con le mucose in corrispondenza degli orifizi delle cavità che si aprono all'esterno (Figura 1). Essa, insieme agli annessi cutanei (ghiandole sebacee, sudoripare e mammarie, follicoli piliferi e unghie), costituisce l'apparato tegumentario che forma un'efficace barriera tra il corpo umano e l'ambiente esterno svolgendo diverse funzioni di protezione nei confronti di infezioni, insulti chimico-fisici, meccanici e termici. La cute ha uno spessore variabile a seconda delle regioni del corpo e si estende per oltre 1,5-2 m<sup>2</sup> in un individuo di media statura e corporatura (Anastasi et al., 2012).

I diversi strati che compongono la cute, procedendo dalla profondità alla superficie, sono: ipoderma, derma ed epidermide.

L'ipoderma è formato prevalentemente da connettivo lasso ricco di fibre elastiche e adipociti e costituisce un piano di clivaggio tra il derma e gli strati profondi, permettendone il reciproco scorrimento. Procedendo verso la superficie si trova il derma formato da tessuto connettivo denso a fasci intrecciati con uno spessore variabile da 0,3 a 4 mm secondo le regioni corporee (Esposito, 2014). Le cellule predominanti nel derma sono i fibroblasti, seguiti da mastociti e macrofagi, oltre a cellule in transito derivanti dal sangue, soprattutto durante fenomeni infiammatori. Il derma è suddivisibile in uno strato papillare, più superficiale e a contatto con l'epidermide, che presenta molte fibre collagene, poche fibre elastiche e reticolari ed è ricco di vasi sanguigni e terminazioni nervose. Lo strato reticolare, più profondo, è costituito da robusti fasci di fibre collagene e numerose fibre elastiche e comprende inoltre formazioni pilifere, ghiandole sudoripare e sebacee. Lo strato più esterno è rappresentato dall'epidermide, un epitelio di rivestimento pavimentoso pluristratificato cheratinizzato il cui spessore varia da 50 µm a 1,5 mm (Anastasi et al., 2012). L'epidermide, il cui citotipo principale è costituito dai cheratinociti, è suddivisa in strati distinti che, procedendo dalla profondità alla superficie, sono: lo strato basale, lo strato spinoso, lo strato granuloso e lo strato corneo (Figura 2).



**Figura 1.** Sezione semifine di cute umana normale dopo colorazione con blu di toluidina. Fotografia ottenuta nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*. Barra= 100  $\mu$ m.



**Figura 2.** Rappresentazione schematica del tessuto epiteliale. Immagine modificata da Anastasi G., Balboni G. e colleghi. *Trattato di Anatomia Umana*; Edi-Ermes.

- Strato basale o germinativo. È lo strato più profondo dell'epidermide, formato da cellule prismatiche o cubiche in monostrato che poggiano su una membrana basale al di sotto della quale si estende il derma. Si tratta di cellule dotate di elevata attività proliferativa, nucleo voluminoso, citoplasma basofilo e asse maggiore perpendicolare alla giunzione dermo-epidermica. Gli elementi cellulari dello strato basale sono in rapporto tra di loro e con quelli dello strato sovrastante mediante desmosomi e con la membrana basale tramite emidesmosomi. Sparsi tra i cheratinociti basali, sempre in questo strato, si trovano cellule derivanti dalle creste neurali, come i melanociti e le cellule di Merkel. Sono inoltre presenti cellule di Langerhans.
- Strato spinoso. Questo strato è formato da 4-8 file di cellule di forma poliedrica, unite tra loro da numerosi desmosomi, localizzati all'estremità di brevi espansioni citoplasmatiche o spine che si affrontano tra cellule adiacenti. Le cellule di questo strato tendono a retrarsi l'una dall'altra, tranne che nei punti connessi da desmosomi, facendo assumere così allo strato il caratteristico aspetto "spinoso". Le zone in cui sono presenti i desmosomi sono aree particolarmente dinamiche, la cui funzione adesiva è controllata da molti segnali di attivazione biochimica e molecolare al fine di promuovere la "rottura" desmosomiale e consentire il transito di cellule come leucociti attraverso i vari strati dell'epidermide. Le cellule dello strato spinoso sono solitamente piuttosto grandi con nuclei scarsamente colorati e nucleoli ben evidenti, indice di intensa attività sintetica di queste cellule. Le cellule dello strato spinoso sintetizzano infatti grandi quantità di citocheratine che si aggregano in tonofibrille. Le cellule di questo strato, in seguito all'esposizione alla luce solare, sono coinvolte anche nella sintesi della vitamina D, importante nella regolazione dell'assorbimento intestinale di fosforo e calcio, nel riassorbimento di calcio a livello renale e nei processi di mineralizzazione dell'osso.
- Strato granuloso. Questo strato è formato da 3-4 file di cellule piuttosto appiattite con un citoplasma ricco di irregolari granuli basofili, i granuli di cheratoialina, non rivestiti da membrana. I granuli contengono proteine ricche principalmente di filaggrina e di tricoialina, che hanno la capacità di aggregare le tonofibrille in fasci più spessi e di conferire loro elasticità e flessibilità. Il citoplasma delle cellule dello strato granuloso contiene anche granuli chiamati cheratinosomi o corpi lamellari, provvisti di membrana dalla caratteristica organizzazione interna a lamelle chiare e scure alternate, ricchi di un complesso materiale lipidico, l'idrossiceramide, che aumenta in modo significativo il grado di impermeabilità dell'epidermide.

Nelle cellule più superficiali di questo strato si osservano una iniziale perdita della forma poliedrica, il progressivo appiattimento delle cellule stesse e, procedendo verso la superficie, alterazioni morfologiche del nucleo e degli organuli cellulari, causate dall'attivazione dell'apoptosi per ridotta presenza di nutrienti e accumulo di tonofilamenti.

- Strato corneo. Questo strato ha uno spessore variabile essendo composto da scaglie e lamine di cheratina. Le scaglie sono costituite dai corneociti, elementi a contorno poligonale, appiattiti, completamente cheratinizzati e completamente privi di nucleo. La cheratina deriva dalle modificazioni del citoplasma cellulare che si consolida formando un materiale fibroso amorfo, costituito principalmente da cheratina e filaggrina. La desquamazione in superficie dipende sostanzialmente da modificazione delle strutture di adesione (desmosomi e materiale intercellulare) tra i corneociti, probabilmente a causa di attività enzimatiche particolari (Esposito, 2014).

La progressiva maturazione e migrazione dei cheratinociti del monostrato basale verso la superficie è un processo complesso e geneticamente programmato definito *differenziazione terminale*. La differenziazione terminale, che nel complesso richiede circa quattro settimane, comporta la formazione di un'importante barriera di difesa per i tessuti sottostanti verso gli insulti esterni ed è in grado di preservare l'omeostasi tissutale. Durante questo processo i cheratinociti perdono la maggior parte degli organelli e il citosol si arricchisce di filamenti intermedi di cheratina, parallelamente in corrispondenza della membrana cellulare tutti i principali sistemi giunzionali vanno incontro a continuo rimodellamento (Anastasi et al., 2012).



## ***Il citoscheletro***

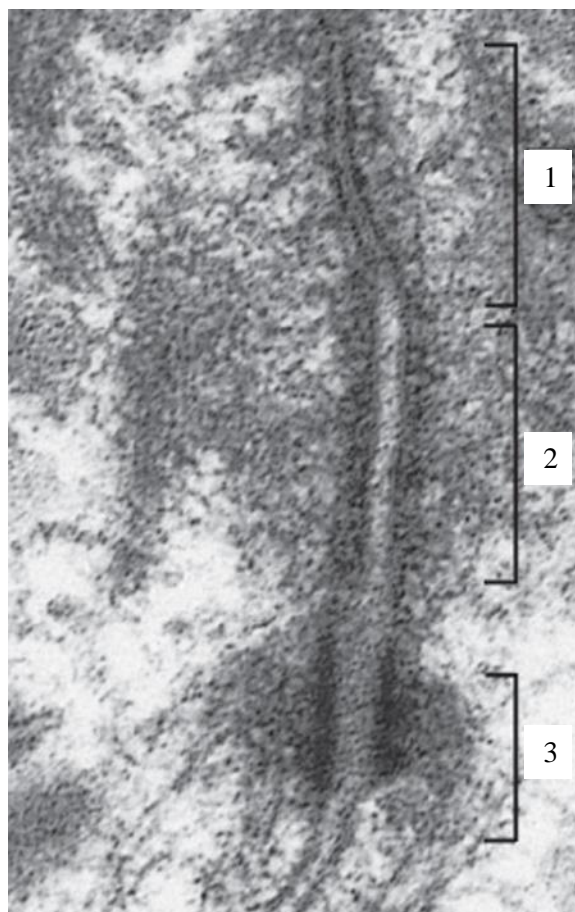
Il rimodellamento citoscheletrico dei cheratinociti epidermici è caratterizzato da un'espressione strato-specifica delle diverse isoforme dei principali filamenti citoscheletrici, le cheratine (K). Le cheratine sono la componente predominante del citoscheletro degli epiteli stratificati cheratinizzati e possono costituire fino all'85% del totale delle proteine nelle cellule corneificate dell'epidermide. Esse sono codificate da una famiglia multigenica di circa 30 membri che appartengono alla famiglia dei filamenti intermedi delle proteine citoscheletriche. Queste proteine hanno una struttura comune costituita da un dominio centrale ad  $\alpha$ -elica, formato da circa 310 aminoacidi, fiancheggiato da domini terminali non elicoidali che sono molto variabili in sequenza e struttura (Steinert and Roop, 1988; Blumenberg, 1993; Fuchs and Weber, 1994). Le cheratine si dividono in due famiglie in base alla sequenza amminoacidica e alla carica: una famiglia di tipo I che comprende le proteine "acide" (cheratine K9-K20) e una famiglia di tipo II che comprende le proteine "basiche o neutre" (cheratine K1-K8). In ogni cellula epiteliale sono coesprese almeno due cheratine, di cui una di tipo I e una di tipo II. Queste proteine sono assemblate in eteropolimeri e formano i filamenti intermedi di cheratina, del diametro di circa 10 nm, che vanno a costituire il citoscheletro nelle cellule epiteliali. Il dominio ad  $\alpha$ -elica è fondamentale per l'assemblaggio delle cheratine in filamenti e contiene tutte le informazioni necessarie per tale procedimento, mentre le varianti dei domini terminali giocano ruoli accessori nell'assemblaggio del filamento e/o interazioni con altre proteine e strutture cellulari. Negli epiteli stratificati cheratinizzati corneificati come l'epidermide i cheratinociti esprimono principalmente le isoforme K5 e K14 a livello dello strato basale, K1 e K10 negli strati differenziati soprabasali (Bragulla and Homberger, 2009). Mutazioni relative alle cheratine 5 e 14 determinano una diminuzione della resistenza agli stress meccanici e lisi delle cellule basali determinando distacco tra i diversi strati epiteliali, come accade ad esempio nell'epidermolisi bullosa (Karantza, 2011). Le cheratine 1 e 10 sono invece coinvolte nel determinare e preservare la stabilità e resistenza meccanica degli strati soprabasali degli epiteli stratificati poiché rappresentano lo scheletro su cui andranno a formare i cornified envelopes. I filamenti intermedi, interagendo con la filaggrina, determinano l'orientamento parallelo alla superficie epiteliale dei fasci di cheratina, di conseguenza la modificazione dell'orientamento dei cheratinociti dello strato granuloso rispetto a quelli dello strato spinoso (Wallace et al., 2012).

La filaggrina è un'abbondante proteina espressa nei cheratinociti differenziati nell'epidermide o in altri epiteli stratificati cheratinizzati, tra cui la gengiva e la lingua (Dale et al., 1993). È sintetizzata a partire da un precursore altamente fosforilato, la profilaggrina, che è costituito da ripetizioni multiple di filaggrina affiancate da un dominio N-terminale e uno C-terminale che differiscono dalla filaggrina stessa. Nell'uomo, la profilaggrina contiene dalle 10 alle 12 unità di filaggrina (Gan et al., 1990). Durante la differenziazione terminale, la profilaggrina è modificata da enzimi, tra cui la fosfatasi PP2A e la endoproteinasi di tipo I, che attraverso defosforilazione e proteolisi producono la filaggrina (Dale et al., 1993; Dale et al., 1994). L'interazione tra filaggrina e cheratina sembra essere importante al fine di facilitare la formazione dei ponti disolfuro tra le catene polipeptidiche della cheratina, per meglio resistere all'imponente processo di rimodellamento derivante dalla differenziazione terminale. Successivamente, la filaggrina è degradata ad aminoacidi liberi e si ritiene svolga un ruolo importante nel mantenimento dell'osmolarità e della flessibilità dell'epidermide. Una quantità limitata di filaggrina permane e viene incorporata nei cornified envelopes (Steinert and Marekov, 1995; Simon et al., 1996).

La cheratina K16 è invece un'isoforma che non risulta normalmente espressa negli epiteli pluristratificati corneificati, ma la sua espressione è caratteristica di cellule in una fase iperproliferativa, come per esempio durante la riparazione di un danno all'epitelio (Presland and Dale, 2000; Bragulla and Homberger, 2009). La K17, come la K16, non è espressa nella cute umana normale (Lan et al., 2014), ma viene rilevata nelle cellule basali di unghie, follicoli piliferi e ghiandole sebacee (Trojanovsky et al., 1989). Nella cute umana risulta espressa negli strati soprabasali in seguito ad alterazioni del differenziamento epidermico, come nel caso della psoriasi.

## ***Adesione intercellulare***

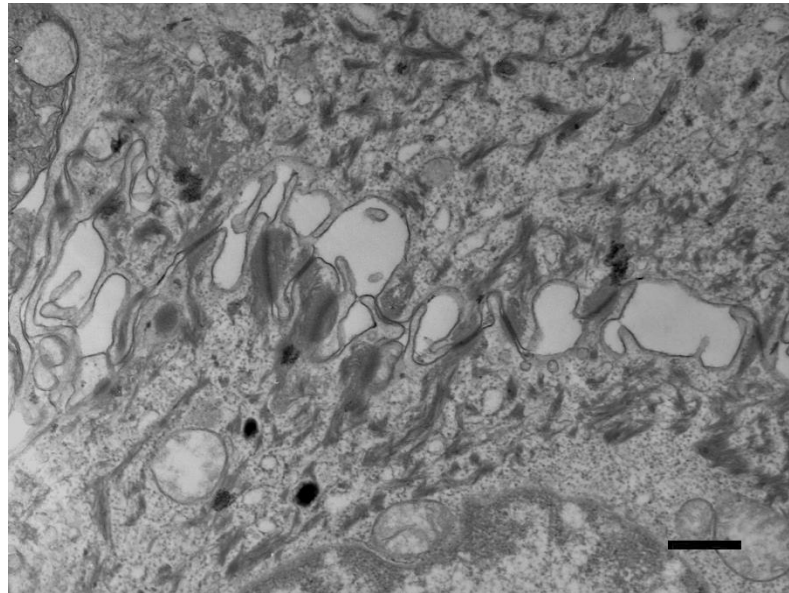
Il rimodellamento delle strutture giunzionali durante la differenziazione terminale è una sequenza di eventi finemente regolata dalla continua comunicazione fra cheratinociti adiacenti che sfruttano le stesse proteine di giunzione per reagire alla stimolazione da parte di agenti fisici e chimici esterni e interni. Nell'epidermide i principali sistemi giunzionali sono i desmosomi, le giunzioni aderenti e le giunzioni occludenti (Figura 3).



**Figura 3.** Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di giunzioni occludenti (1), aderenti (2) e desmosomi (3). Immagine modificata da Stevens A., Lowe J. *Istologia Umana*; Casa Editrice Ambrosiana.

Tra le giunzioni, le più abbondanti sono i desmosomi che negli epiteli stratificati garantiscono resistenza a stress meccanici grazie alle interazioni non covalenti delle proteine che li compongono. Prendono parte all'organizzazione del citoscheletro, alla trasduzione di segnali inter- e intra-cellulari e al processo di differenziazione terminale (Green and Simpson, 2007) (Figura 4). Nei desmosomi, dal punto di vista strutturale, è possibile riconoscere una placca citoplasmatica sub-plasmalemmale a cui si ancorano i filamenti del citoscheletro.

D'altro canto, le glicoproteine transmembrana mediano il contatto diretto fra le cellule (Holthofer et al., 2007). I desmosomi mantengono un aspetto costante, ma possono variare di dimensioni. Dal punto di vista ultrastrutturale i desmosomi appaiono come placche elettrondense tripartite e simmetriche, strettamente associate alla membrana citoplasmatica di cellule adiacenti e ai filamenti di cheratina (Green and Simpson, 2007).



**Figura 4.** Fotografia al microscopio elettronico a trasmissione di desmosomi in una sezione fine di cute umana normale. Fotografia ottenuta nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*. Barra= 500 nm.

I desmosomi sono complessi multiproteici transitori composti da diverse proteine: le caderine desmosomiali, le proteine armadillo e le plachine. Al di sotto della membrana cellulare le desmoplachine mediano l'interazione fra le proteine di giunzione e i filamenti intermedi di cheratina, mentre le proteine armadillo (placoglobine e placofiline) interagiscono con la coda intracellulare delle caderine desmosomiali e costituiscono la placca desmosomiale. Le caderine desmosomiali sono glicoproteine transmembrana che garantiscono l'adesione intercellulare in presenza di calcio grazie a un'interazione diretta, omofilica o eterofilica, tra le loro porzioni extracellulari (Garrod et al., 2002; Ishii, 2003). Le caderine desmosomiali sono suddivisibili in due gruppi: le *desmocolline* (Dsc) e le *desmogleine* (Dsg) di cui sono note, ad oggi, rispettivamente tre (Dsc1-3) e quattro (Dsg1-4) diverse isoforme (Garrod et al., 2002; Mahoney et al., 2006). L'espressione differenziale delle isoforme di caderine desmosomiali, ciascuna codificata da un gene diverso, è legata allo stadio differenziativo dei cheratinociti all'interno di un singolo epitelio ed è specifica per ciascun epitelio.

Nell'epidermide l'adesione intercellulare nei desmosomi è principalmente mediata da Dsc1 e Dsg1 (Donetti et al., 2005; Mahoney et al., 2006). Dsc1 e Dsg1 sono localizzate a livello della membrana di tutti i cheratinociti degli strati soprabasali (North et al., 1996). Queste due caderine desmosomiali hanno espressione diversa in funzione del grado di differenziazione terminale dei cheratinociti dell'epidermide (Garrod et al., 2002). Studi sperimentali condotti su piccoli roditori dove è stata eliminata l'espressione della Dsc1 hanno evidenziato una stretta correlazione tra Dsc1 e cheratinizzazione epidermica con conseguente alterazione della differenziazione terminale (Henkler et al., 2001). In seguito all'assemblaggio delle proteine desmosomiali, i desmosomi vanno incontro a una fase maturativa durante la quale subiscono modificazioni post-traduzionali che permettono il raggiungimento di una maggiore stabilità della giunzione e mediano l'adattamento dei desmosomi alle esigenze cellulari dettate dall'ambiente esterno, suggerendo un ruolo delle caderine desmosomiali non solo nel conferire resistenza meccanica all'epidermide, ma anche nella trasduzione di segnali intracellulari (Green and Gaudry, 2000).

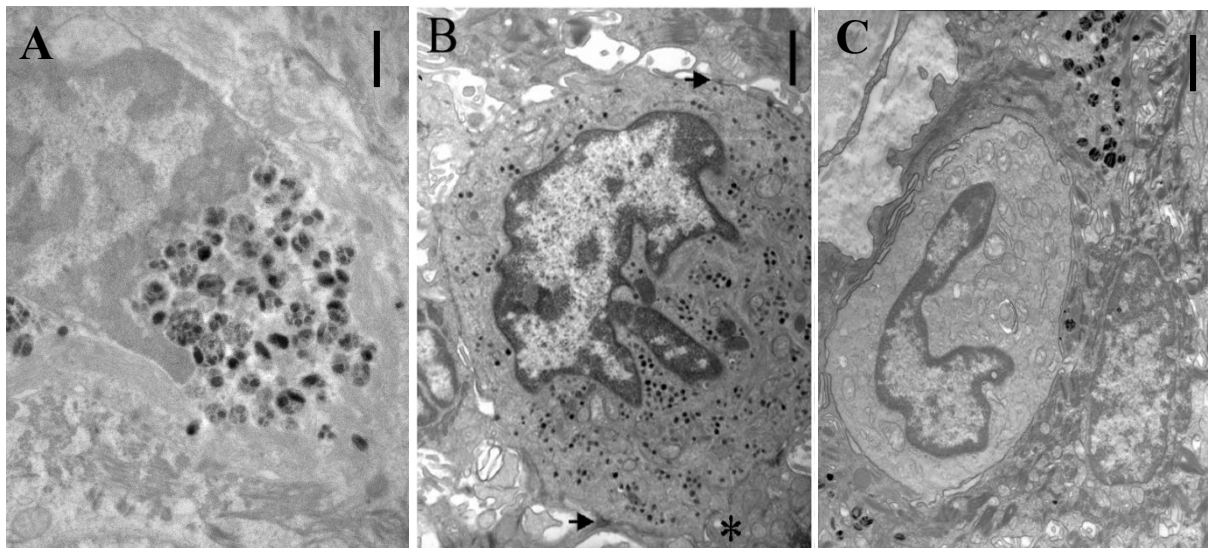
Le giunzioni aderenti sono la prima tipologia di giunzioni che si forma fra cheratinociti adiacenti. Hanno un ruolo fondamentale nella morfogenesi dei tessuti e la mancata formazione di giunzioni aderenti efficienti inibisce l'assemblaggio dei desmosomi (Kitajima, 2002). Le giunzioni aderenti hanno un'organizzazione strutturale simile ai desmosomi, anche se a livello ultrastrutturale sono meno identificabili a causa della mancanza della struttura tripartita tipica dei desmosomi e per l'ancoraggio meno evidente dei filamenti di actina alle proteine della placca. Analogamente ai desmosomi, sono formate da proteine di connessione che mediano l'interazione con filamenti citoscheletrici di actina e dalle caderine classiche (*E-caderina* e *P-caderina*), che differiscono per lunghezza e composizione della coda citoplasmatica dalle caderine desmosomiali (Presland and Dale, 2000). Un'eventuale riduzione di espressione della E-caderina può suggerire un danno epiteliale e l'avvio degli eventi iniziali di trasformazione dell'epitelio in senso tumorale. A partire dalle giunzioni aderenti ha inizio l'assemblaggio dei desmosomi; questi due sistemi giunzionali interagiscono sia a livello delle proteine transmembrana sia tramite le proteine leganti i filamenti citoscheletrici e i filamenti stessi (Holthofer et al., 2007).

A differenza degli altri sistemi giunzionali, le giunzioni occludenti si mostrano all'analisi ultrastrutturale come punti di contatto diretto fra le membrane plasmatiche, i cosiddetti kissing points, e costituiscono una barriera idrofobica che impedisce la diffusione di ioni per via paracellulare nell'epitelio.

L'*occludina* risulta essere una delle principali componenti delle giunzioni occludenti e, nell'epidermide, è espressa esclusivamente nello strato granuloso. Tuttavia molte giunzioni contenenti proteine correlate alle giunzioni occludenti, come per esempio la *zona occludens-1* (ZO-1), sono riscontrabili anche negli strati più profondi contribuendo alla stabilità della citoarchitettura epiteliale (Langbein et al., 2002; Brandner, 2009).

### ***Citotipi epidermici***

Oltre ai cheratinociti, citotipo predominante dell'epidermide, vi sono altre popolazioni numericamente minori, che rappresentano complessivamente circa il 10-15% delle cellule epidermiche, distinte per origine, funzione e destino: i **melanociti**, le **cellule di Langerhans**, le **cellule di Merkel** ed i linfociti (Figura 5).



**Figura 5.** Fotografie al microscopio elettronico a trasmissione di melanocita (A), cellula di Merkel (B), e cellula di Langerhans (C). Nella figura B le frecce nere indicano i desmosomi e l'asterisco la terminazione assonica. Fotografie ottenute nel *Laboratorio di Immunoistochimica degli Epiteli*. Barre= 500 nm.

I melanociti (Figura 5 A) sono cellule localizzate preferenzialmente nello strato basale dell'epidermide e sono deputate alla sintesi di melanina. Dal punto di vista strutturale non presentano né tonofilamenti né desmosomi, ma contengono i melanosomi in cui viene sintetizzata la melanina. I melanociti sono deputati alla protezione della pelle dalle radiazioni ultraviolette. Le cellule di Merkel (Figura 5 B) sono localizzate nello strato basale dell'epidermide, in prossimità di una terminazione nervosa. A livello ultrastrutturale sono caratterizzate dalla presenza di granuli elettrondensi nel citosol e la superficie cellulare presenta protrusioni digitiformi che sembrano avere un ruolo nella funzione meccanocettiva di queste cellule. Le cellule di Merkel presentano tonofilamenti e sono connesse ai cheratinociti adiacenti a differenza dei melanociti.

Le cellule di Langerhans (Figura 5 C) sono una sottoclasse di cellule dendritiche che popolano lo strato epidermico, rappresentando il 3-4% di tutte le cellule nucleate in questo compartimento. Sono di derivazione mieloide, sebbene recenti studi abbiano dimostrato anche una capacità di autorinnovamento (Merad et al., 2008). Il loro differenziamento può essere indotto da diverse citochine, quali granulocyte-macrophage stimulating factor (GM-CSF), tumour necrosis factor (TNF)-alfa e interleuchina (IL)-17 (Prignano et al., 2001).

Le cellule di Langerhans sono in grado di riconoscere e processare gli antigeni con cui vengono a contatto nell'epidermide e, in seguito, di migrare verso i linfonodi distrettuali, presentando una spiccata attività di stimolazione linfocitaria. Nel loro citoplasma sono riconoscibili al microscopio elettronico a trasmissione i caratteristici granuli di Birbeck con potenziale attività di endocitosi recettore-mediata e funzione di trasporto di materiale cellulare nello spazio extracellulare. Attraverso i loro prolungamenti dendritici formano un continuo network cellulare che protegge l'epidermide da antigeni, in particolare sono coinvolte nel riconoscimento dell'antigene e nella sua presentazione ai linfociti T contribuendo alla prima barriera immunologica della pelle contro l'ambiente esterno (Merad et al., 2008). La langerina espressa sulla loro membrana citoplasmatica viene ormai considerata un marcatore univoco per queste cellule (Valladeau et al., 2002). La langerina è una proteina transmembrana lectinica di tipo C espressa ad alti livelli dalle cellule di Langerhans. Il recettore lega diversi ligandi glicosilati ma ha una specificità di legame per il mannosio. La langerina svolge diverse funzioni, come ad esempio nell'adesione cellulare, nel reclutamento delle cellule Natural Killer, e in particolare nell'attivazione delle cellule dendritiche dove la funzione di cattura dell'antigene dalla langerina porta alla formazione dei granuli di Birbeck, il cui ruolo non è stato ancora ben chiarito (Stambach et al., 2003; Merad et al., 2008). Hanno inoltre un'elevata affinità per CD1a, una molecola simile al complesso di istocompatibilità I, in grado di presentare i lipidi di origine microbica ai linfociti T (Thomas et al., 1984).

Il potenziale ruolo delle cellule di Langerhans nella modulazione della risposta immune della pelle che si verifica durante l'infiammazione della cute, suggerisce come queste cellule siano coinvolte nelle patologie dermatologiche autoimmuni tra cui la psoriasi.

## *La psoriasi*

La psoriasi è una patologia che colpisce circa 25 milioni di giovani adulti geneticamente predisposti negli Stati Uniti ed in Europa (Lowes et al., 2007). La psoriasi viene attualmente considerata un'affezione a carattere sistemico per il coinvolgimento di numerosi organi e apparati determinato dall'associazione di fattori genetici predisponenti e di fattori ambientali scatenanti capaci di innescare una reazione immunologica specifica mediata prevalentemente da linfociti T (Fabbri, 2012).

La prevalenza della psoriasi in Europa e negli Stati Uniti varia dal 1% al 4% della popolazione totale e dal 6% al 12% dei pazienti dermatologici. La razza caucasica è la più colpita, mentre molto rara è l'incidenza nelle popolazioni di colore e la malattia è praticamente assente fra gli eschimesi e gli indiani d'America. In Italia la prevalenza della psoriasi nell'età adulta viene valutata intorno al 3-4%. Le forme gravi di psoriasi rappresenterebbero circa il 10%, con un grave impatto sulla qualità di vita dei pazienti (Raychaudhuri et al., 2001). La psoriasi colpisce i due sessi con uguale frequenza nell'età adulta, tuttavia in età infantile e giovanile le femmine sono più colpite tra i 5 e i 9 anni, mentre i maschi tra i 15 e i 19 anni. Nei bambini compare spesso in modo eruttivo dopo un'infezione streptococcica. Una familiarità è dimostrabile in più di un terzo dei pazienti. Pur potendo manifestarsi in qualunque età, sono stati riscontrati due picchi di insorgenza: uno precoce (16-22 anni) ed uno tardivo (57-60 anni). I soggetti con familiarità per psoriasi mostrano la tendenza ad un esordio precoce ed il rischio di sviluppare la psoriasi nel corso della vita risulta tre volte maggiore nei discendenti dei soggetti affetti precocemente da questa malattia, rispetto ai discendenti di coloro che l'avevano sviluppata dopo i 30 anni. L'esordio precoce si accompagna anche ad una maggiore gravità delle manifestazioni (Raychaudhuri et al., 2001).

Rappresenta una malattia clinicamente eterogenea, con sottotipi clinici ben definiti, tra cui la psoriasi cronica a placche (o psoriasi volgare), la psoriasi guttata, e la psoriasi (pustolosa) generalizzata o localizzata. La forma cronica a placche è la più comune (85-95%), insorge preferenzialmente in corrispondenza dei gomiti, delle ginocchia e del cuoio capelluto sotto forma di placche rossastre con scaglie superficiali (Figura 6). Nella psoriasi, da un punto di vista istologico, si osserva un inspessimento dell'epidermide, conseguente all'iperproliferazione dei cheratinociti, e le proiezioni dell'epidermide nel derma sottostante sono molto allungate e sottili. Nel complesso, la differenziazione terminale dei cheratinociti è profondamente alterata e i cheratinociti dello strato corneo non sono più in grado di aderire reciprocamente, spiegando così la comparsa delle scaglie superficiali e la perdita della



barriera di protezione. Inoltre, nel derma papillare, si verifica una dilatazione dei vasi sanguigni, che contribuisce all'arrossamento in corrispondenza delle placche psoriatriche. Sono presenti nel derma e nell'epidermide della cute psoriatrica numerosi infiltrati di cellule infiammatorie sia mononucleate sia polimorfonucleate (Scarpa et al., 2010). Si caratterizza, in quanto autoimmune, come una "sindrome clinica causata dall'attivazione delle cellule T e/o B, in assenza di un'infezione evidente o di un'altra causa diagnosticabile" (Davidson and Diamond, 2001). Il ruolo svolto dalle cellule del sistema immunitario nella psoriasi è molto simile a quello riscontrato in altre patologie su base immunitaria, quali il morbo di Crohn, l'artrite reumatoide, la sclerosi multipla e il diabete giovanile. Componenti genetiche e/o ambientali possono comunque influenzare l'evoluzione della patologia. La base genetica della psoriasi è supportata dalla maggiore incidenza della malattia osservata in parenti di primo e secondo grado di pazienti affetti (Farber and Nall, 1974) e un aumento del rischio di 2-3 volte nei gemelli monozigoti rispetto ai gemelli eterozigoti.

Da un punto di vista molecolare, non è ancora stato identificato il gene o il trascritto responsabile della patologia, ma sono stati identificati almeno 9 loci di suscettibilità (Bowcock and Barker, 2003). Gli studi degli antigeni leucociti umani (HLA) hanno individuato una variante, HLA-Cw6, fortemente legata alla psoriasi, in particolare la forma ad esordio precoce (Schmitt-Egenolf et al., 1996). Analisi genomiche hanno identificato più loci cromosomici statisticamente legati alla suscettibilità della psoriasi (PSORS1-12) (Lowes et al., 2007). Il più importante di questi loci è PSORS1 localizzato all'interno del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul cromosoma 6p21.3 ed è coinvolto nel 30-50% dei casi. Recentemente è stata suggerita una ramificazione di questo locus. L'HLA-C è coinvolto nella presentazione dell'antigene verso le cellule CD8+ e Natural Killer-T (NK-T). Sempre sul braccio corto del cromosoma 6 esistono altri geni correlati alla malattia: HCR e CDSN (corneodesmosina). Il polimorfismo di HCR è associato ed aumentato nella psoriasi volgare, mentre CDSN codifica per la corneodesmosina, una proteina specifica della cute, iperespressa nella psoriasi. PSORS2 (17q24-q25) è invece associato alla popolazione caucasica americana, irlandese e svedese; PSORS3 (4q34) ad un gruppo di famiglie irlandesi; PSORS4 (1q21) alla popolazione laziale e statunitense; questo locus risulta particolarmente interessante in quanto risiede nel complesso di differenziazione epidermica del cromosoma 1q; PSORS5 (3q21) è stato studiato in un gruppo di famiglie svedesi; PSORS7 e PSORS8 si trovano rispettivamente sul cromosoma 1p35 e 16q12. Oltre a questi geni ne esistono altri, i cosiddetti geni modificati come ad esempio Tumor Necrosis Factor-alfa (TNF-alfa), Interleuchina-10 (IL-10), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), responsabili, probabilmente, della gravità e della diversità delle manifestazioni cliniche della

psoriasi. Recentemente un nuovo gene, KIR2DS1, è stato associato alla psoriasi. Si tratta del gene che attiva il recettore delle cellule Natural Killer (NK). Tale recettore è costituito da immunoglobuline e sarebbe responsabile del riconoscimento delle molecole HLA-C da parte delle cellule NK. Un'overespressione di tale gene sembra essere associata alla psoriasi, mentre un gene della stessa famiglia, ma con attività inibente, avrebbe un'azione protettiva. Negli ultimi anni lo studio della patogenesi della psoriasi ha suscitato grande interesse nell'ambito della ricerca scientifica, consentendo di migliorare le conoscenze riguardo ai meccanismi alla base della psoriasi. Per lungo tempo la psoriasi è stata considerata come una patologia causata unicamente da un'alterata proliferazione e differenziazione terminale dei cheratinociti. Recenti studi hanno evidenziato il ruolo fondamentale delle cellule del sistema immunitario, tra le quali le cellule dendritiche (Johnson-Huang et al., 2009) e i linfociti T (Davison et al., 2001). In particolare le sottopopolazioni Th1 e Th17 dei linfociti sono coinvolte nel rilascio di numerose citochine pro-infiammatorie, come Tumor Necrosis Factor (TNF)-alfa, interleuchina (IL)-17 e IL-22, rilevanti nei processi che regolano la cascata infiammatoria (Wolk et al., 2006; Mabuchi et al., 2012).



**Figura 6.** Tipiche lesioni di pazienti affetti da psoriasi. Immagine tratta da Schon M.P. and Boehncke W.H. (2005) the New England Journal of Medicine 352:1899-1912.

## ***Psoriasi e citochine pro-infiammatorie***

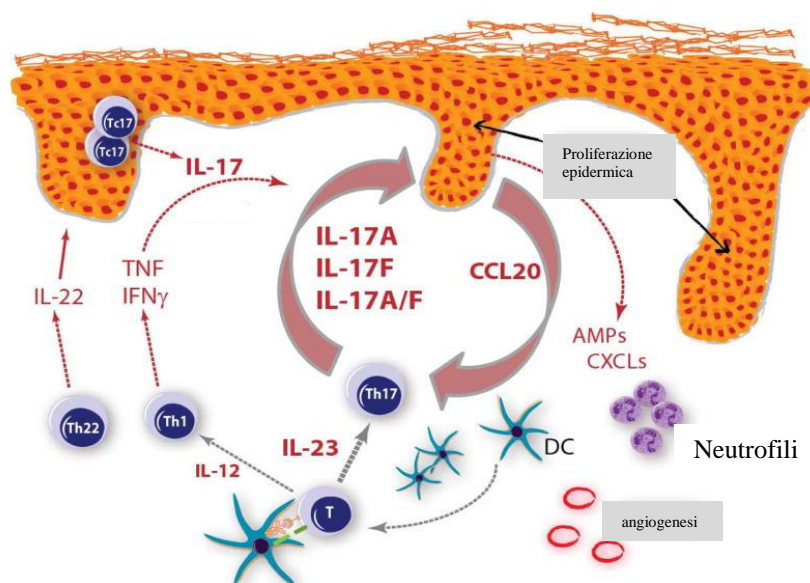
Le citochine rappresentano un insieme eterogeneo di molecole che comprendono le ematopoietine, le chemochine, le interleuchine e il Tumor Necrosis Factor. Le citochine hanno breve emivita, possiedono attività autocrina e/o paracrina e sono sintetizzate de-novo attraverso lo stimolo di diversi fattori. Hanno effetti pleiotropici a seconda del tipo cellulare al quale si legano e le loro funzioni biologiche possono essere ridondanti. Molte di loro possono indurre o inibire la produzione di altre citochine attraverso il legame con i propri recettori (Pier et al., 2006). Queste molecole sono prodotte da linfociti, dalle cellule endoteliali e dalle cellule epiteliali e sono rilasciate nell'ambiente extracellulare. In particolare, i cheratinociti epidermici, producono diverse citochine tra cui IL-1, 6, 7, 8, 10, 12, 15, 18, 20, TNF-alfa e interferone (IFN)  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  (Gröne, 2002).

Nella psoriasi le citochine agiscono sui cheratinociti inducendo o inibendo l'espressione di altre chemochine che, a loro volta, reclutano ulteriori cellule che partecipano alla formazione della placca psoriasica come le cellule dendritiche mieloidi, i Th17 e i neutrofili creando così un circuito a feed-back positivo (Gaffen, 2009; Nestle et al., 2009).

**TNF-alfa** è una citochina infiammatoria trimerica prodotta da macrofagi, mastociti, cellule linfoide, cellule endoteliali e fibroblasti. TNF-alfa svolge le sue funzioni attraverso due recettori di membrana il TNFR1 e il TNFR2. Il primo recettore è espresso in maniera costitutiva nella maggior parte dei tessuti, il secondo è espresso solo nelle cellule immunitarie, epiteliali e neuronali ed è inducibile (Kristensen et al., 1993). Nei cheratinociti, la trasduzione del segnale recettore-ligando attiva diverse vie come quella di NF- $\kappa$ B, di AP-1 e della caspasi 3 inducendo sia la risposta immunitaria e infiammatoria che il rimodellamento tissutale, la motilità cellulare, il ciclo cellulare e l'apoptosi (Banno et al., 2004). Inoltre l'attivazione del TNF-alfa provoca l'induzione sia autocrina sia di diverse citochine come IL-22 (Le Hir et al., 1995). La sua espressione e quella dei suoi recettori è molto elevata nella psoriasi e, anche se il suo esatto ruolo nell'eziopatogenesi risulta ancora da chiarire, numerosi studi hanno dimostrato che induce produzione di chemochine, proliferazione cellulare ed apoptosi (Aggarwal et al., 2012). Tuttavia, l'efficacia dei farmaci biologici anti TNF-alfa è ampiamente dimostrata in clinica e suggerisce che l'importanza del TNF-alfa nello sviluppo della patologia sia rilevante (Ducharme and Weinberg, 2008; Zaba et al., 2010; Donetti et al., 2012).

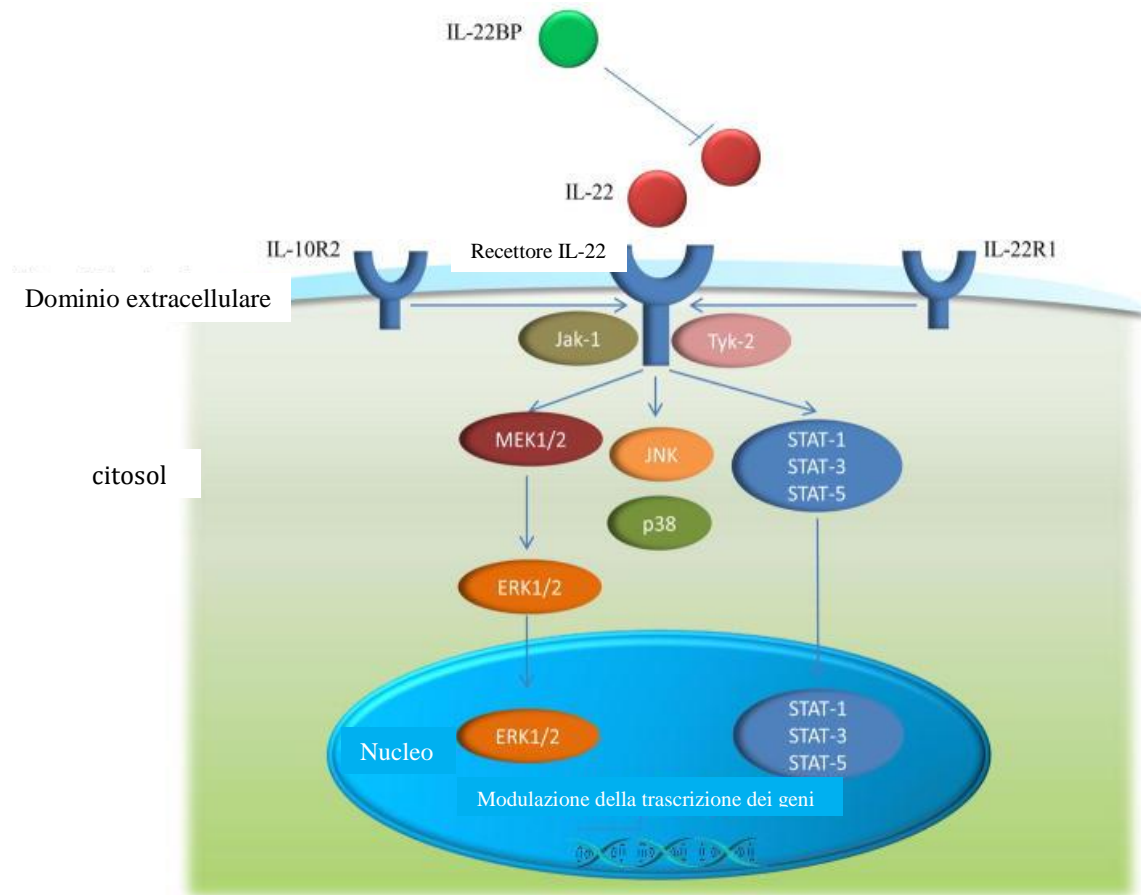
Un ruolo sempre più centrale nell'insorgenza e nella progressione della psoriasi è attribuito a **IL-17**, una glicoproteina di 15 KD costituita da 155 amminoacidi e presente in sei diverse isoforme, indicate con le lettere dalla A alla F, come omo o eterodimeri (Figura 7).

Le isoforme A ed F sono quelle di maggior impatto. IL-17 è una citochina sintetizzata e rilasciata principalmente da una sottopopolazione di linfociti T helper, definiti per questa loro attività Th17 (Sweeney et al., 2011). Il suo recettore è un eterodimero costituito da 3 subunità (due IL17RA e una IL17RC) ampiamente espresso sulle cellule epiteliali, fibroblasti, cellule B e T e monociti. IL-17 induce l'espressione di numerose chemochine coinvolte nel reclutamento in sede della lesione di diverse specie cellulari come neutrofili, cellule dendritiche e Th17. Attraverso l'espressione di CCL20, il cui recettore CCR6 è espresso sulla superficie di cellule dendritiche e Th17, promuove un feedback positivo di mantenimento dell'infiammazione (Sweeney et al., 2011). A livello molecolare è stato dimostrato che questa citochina agisce attraverso i pathways STAT1/3 (Langrish et al., 2005; Shi et al., 2011; Mabuchi et al., 2012). Nella cute psoriasica sono stati riscontrati sia un accumulo di linfociti Th17 (Lu et al., 2010) sia un'aumentata espressione di IL-17 (Teunissen et al., 1998) rispetto alla cute normale. Poiché il recettore per tale citochina è presente sulla membrana cellulare di numerosi citotipi, l'azione complessiva indotta da IL-17 è ad ampio spettro pro-infiammatoria (Yao et al., 1995). Inoltre, induce l'espressione della cheratina (K)17 nelle lesioni psoriasiche (Fu and Wang, 2012) e la sintesi di beta-defensine con conseguente aumento dello stimolo infiammatorio (Adami et al., 2014). L'espressione della filaggrina, biomarker di differenziazione terminale avanzata, è ridotta, provocando una profonda alterazione della barriera cutanea (Girolomoni et al., 2012; Miossec and Kolls, 2012).



**Figura 7.** Ruolo di IL-17 nella patogenesi della psoriasi. Immagine tratta e modificata da Martin A. et al. (2013) J Invest Dermatol 133:17-26.

**IL-22** appartiene alla famiglia delle interleuchine 10, viene prodotta da un sottotipo di linfocita identificato nella psoriasi T CD4<sup>+</sup> Th22 e dalle cellule Th17 (Figura 8). Il gene che codifica per IL-22 umana è localizzato sul cromosoma 12q15 tra il locus per IFN- $\gamma$  e quello per IL-26. Agisce attraverso un complesso recettoriale transmembrana formato da due subunità: IL-22R1 e IL-22R10. IL-22R10 è ubiquitariamente espresso, mentre IL-22R1 è espresso nel fegato, nel colon, nel pancreas, nella milza e nella cute. Questo recettore eterodimerico trasduce il segnale tramite i pathways di STAT1/3 e di ERK1/2. Questa cascata di trasduzione ha come bersaglio finale l'attivazione o l'inibizione di diversi geni nei cheratinociti provocando acantosi, attraverso l'aumento della proliferazione e l'inibizione del differenziamento terminale dei cheratinociti (Boniface et al., 2005; Nograles et al., 2009; Zhang et al., 2012). IL-22 altera il processo di differenziazione terminale dei cheratinociti e, come IL-17, induce l'espressione aberrante di K17 nella cute psoriasica (Zhang et al., 2012).



**Figura 8.** Ruolo di IL-22 nella patogenesi della psoriasi. Immagine tratta e modificata da Pan H. et al. (2013) J Cytokine Growth Factor Rev 24:51-57.

## ***Terapia della psoriasi***

Nella cura della psoriasi possono essere utilizzate terapie locali e sistemiche. Le terapie locali o topiche sono limitate alla superficie cutanea e comprendono ad esempio creme, unguenti, gel, pomate, lozioni e mousse. Questi trattamenti si effettuano direttamente sulla lesione psoriasica da trattare. Tra i prodotti topici ricordiamo sia emollienti e idratanti sia veri e propri farmaci come il cortisone e i derivati della vitamina A e D. Le terapie sistemiche, per via orale o sottocutanea, richiedono particolare attenzione, poiché alcune di esse determinano effetti collaterali importanti. Nell'ambito dei prodotti sistemici esistono le terapie tradizionali da un lato, e i farmaci biologici di nuova concezione, dall'altro (Gottlieb, 2005).

Tra le terapie tradizionali le più utilizzate sono gli analoghi della vitamina A, le radiazioni ultraviolette, il metotressato e la ciclosporina. Le radiazioni ultraviolette rivestono un ruolo di rilievo nella terapia della psoriasi e sono erogate mediante l'uso di lampade specifiche che emettono radiazioni di tipo A (UVA) (320-400 nm) e di tipo B (UVB) a banda larga (290-320 nm) o banda stretta (311-312 nm) (Vangipuram and Feldman, 2015).

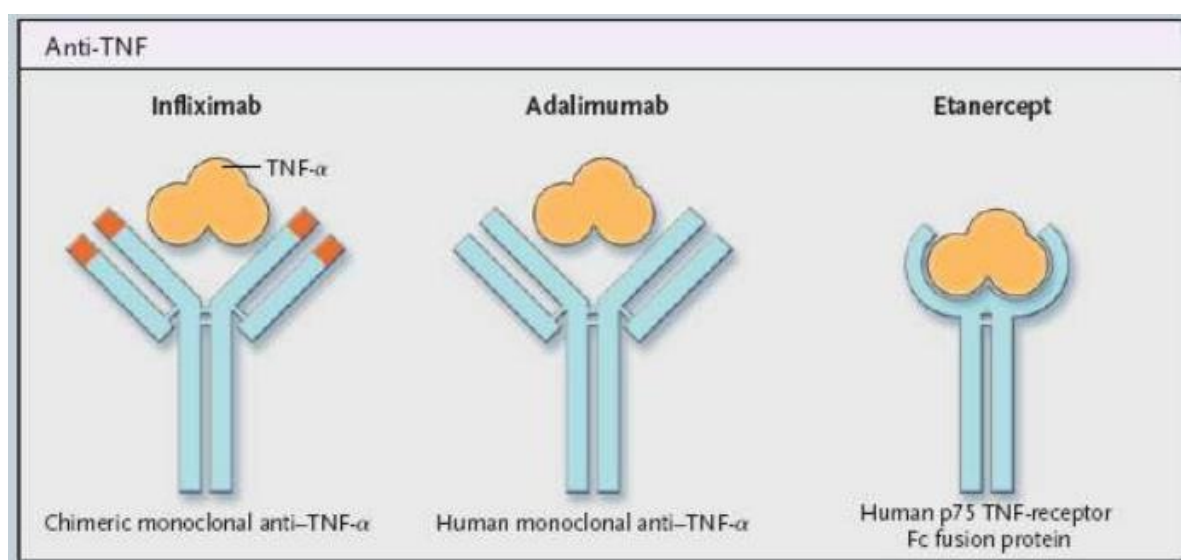
La scelta tra terapie topiche e sistemiche dipende dall'estensione, dalla gravità e dalle condizioni generali del paziente. Le terapie topiche sono adatte per i casi meno gravi e possono normalmente essere usate anche per lunghi periodi. Essendo il loro uso locale, esse non comportano un assorbimento sistemico e gli effetti collaterali sono principalmente locali (reazioni allergiche o irritative, assottigliamento, secchezza). Le terapie sistemiche tradizionali sono invece utilizzate per i casi di psoriasi moderata-grave, i quali sono circa il 25-30% del totale. Esse hanno una elevata efficacia nel controllo a breve termine della psoriasi, ma non sono adatte al trattamento a lungo termine, poiché tutte possiedono una soglia di tossicità che limita il loro uso prolungato. Questo porta alla necessità di associare, combinare le terapie e/o i regimi di trattamento. Nella terapia tradizionale i farmaci comunemente usati sono il metotressato e la ciclosporina. Questi farmaci non hanno azione immediata e quindi vanno assunti qualche settimana prima che si manifesti il loro effetto benefico. Durante questa terapia sono necessari controlli periodici al fine di controllare eventuali effetti collaterali. L'uso del cortisone è limitato alle forme di psoriasi particolarmente gravi.

Purtroppo queste terapie tradizionali, sia a causa dei gravi effetti collaterali sia a causa della limitata efficacia nel tempo, deludono spesso le aspettative dei pazienti. Terapia sistemica di più recente introduzione sono invece i farmaci biologici, ossia farmaci estremamente

selettivi che puntano a colpire una singola struttura (recettore, proteina, sequenza di DNA) in modo preciso, riducendo così gli effetti collaterali e aumentando l'efficacia della terapia.

Nella cura della psoriasi i farmaci biologici comprendono un gruppo di molecole eterogenee in grado di modulare l'attività dei linfociti T o di diverse citochine. I farmaci biologici più comunemente utilizzati in clinica sono quelli che agiscono contro la molecola solubile o sul recettore del TNF-alfa (Menter et al., 2008). Il TNF-alfa svolge la sua azione a livello della placca psoriasica, quindi a livello cutaneo. Il blocco dell'attività di questa citochina, pertanto, consente di controllare, anche se in modo limitato, la formazione della placca, lasciando liberi di agire i linfociti T attivati (Sterry et al., 2004). Tra questi farmaci anti-TNF-alfa ricordiamo ad esempio l'Etanercept, l'Infliximab e l'Adalimumab.

L'Etanercept (Enbrel)<sup>®</sup> è una proteina di fusione del recettore umano p75 del fattore TNF-alfa con la frazione Fc dell'immunoglobulina umana IgG1. La proteina funziona da recettore solubile per il TNF-alfa circolante. Adalimumab (Humira)<sup>®</sup> e Infliximab (Remicade)<sup>®</sup> sono anticorpi monoclonali, il primo interamente umano ed il secondo chimerico (umano-murino), che si legano con alta specificità e affinità sia alla forma solubile che a quella transmembrana del TNF-alfa, inibendone l'attività (Figura 9).



**Figura 9.** Rappresentazione schematica dei principali. Immagine tratta e modificata da N Engl J Med (2009) 361:496-509.

Anche i farmaci biologici, purché efficaci, presentano effetti collaterali, tra cui i più comuni sono le reazioni nel sito d'iniezione: rossore, bruciore e prurito nella sede d'iniezione.

Le reazioni ad infusione sono in genere lievi come nausea, vomito; orticaria nel 2%; l'anafilassi è rara; le reazioni cutanee sono possibili anche dopo 15 giorni dall'infusione (Infliximab) (Cheifetz and Mayer, 2005). I più importanti effetti collaterali riguardano l'aumentato rischio di infezioni di ogni tipo, specie batteriche e fungine. In caso d'insorgenza d'infezione questi farmaci devono essere interrotti, temporaneamente o in modo definitivo secondo i casi (Desai and Furst, 2006).

Con l'uso di anti-TNF-alfa si possono verificare, anche se solo molto raramente, complicanze neurologiche, come malattie demielinizzanti, per questo motivo questi farmaci sono controindicati nei pazienti con malattie demielinizzanti quali ad esempio la sclerosi multipla (Desai et al., 2006).

Poiché i farmaci biologici inibiscono parzialmente l'attività del sistema immunitario, che è importante nel combattere lo sviluppo di tumori, è teoricamente possibile che l'uso di tali farmaci, in particolare per periodi prolungati e ad alte dosi, possa causare un aumento della frequenza di tumori (Patel et al., 2009). Dai dati finora disponibili sembra tuttavia che tale effetto collaterale sia molto raro (Patel et al., 2009).



## ***Modelli sperimentali***

Per lo studio delle interazioni cellulari e dell'eziopatogenesi della psoriasi i modelli sperimentali sono numerosi, ma ciascuno presenta limitazioni. Per quanto riguarda i modelli in vitro fino ad oggi non è stato standardizzato nessun modello in grado di studiare i processi cellulari iniziali alla base della formazione della lesione psoriasica. Attualmente non sono a nostra disposizione colture primarie di cheratinociti psoriasici e, di conseguenza, non è possibile studiare gli effetti di diversi agenti sulle cellule epidermiche in vitro. Tra i modelli standardizzati per lo studio della psoriasi ritroviamo colture in monostrato di cheratinociti, in cui non si osservano né stratificazione né differenziazione terminale (Moharamzadeh et al., 2007). Nei primi anni '80 è stato introdotto un metodo di coltura che prevedeva un monostrato di cheratinociti senza un supporto sotto-epiteliale. Questo modello non è stato in grado di mimare le caratteristiche dell'epitelio in vivo poiché i cheratinociti non andavano incontro né a stratificazione né a differenziazione terminale. Per quanto riguarda i modelli in vivo, sono stati creati ceppi di topi geneticamente modificati in cui è stata mutata l'espressione di fattori di crescita, delle molecole di adesione o dei mediatori dell'infiammazione (Xia et al., 2003; Nestle and Nickoloff, 2005). Considerando le profonde differenze tra la cute umana e quella murina si è però giunti ad ottenere solo un'iperplasia dei cheratinociti del follicolo pilifero, senza riuscire a riprodurre fedelmente le caratteristiche della cute psoriasica. Spesso, inoltre, si è osservata alopecia e mortalità neonatale, entrambi sintomi normalmente assenti in clinica. In questo ambito, un approccio interessante è rappresentato da trapianti di cute umana normale o psoriasica in topi con deficit immunitari poiché ciò ha reso possibile riprodurre un quadro patologico molto simile a quello della psoriasi (Raychaudhuri et al., 2001).

Nuove strade nello studio della biologia della cute si sono aperte con l'avvento dei modelli di cute umana ricostruita in vitro composta da un multistrato di cheratinociti coltivato su diversi tipi di matrici naturali o sintetiche, quali mucosa de-epitelizzata bovina, collagene e membrane permeabili di policarbonato (Rosdy and Clauss, 1990; Margulis et al., 2005; Netzlaff et al., 2005; Sa et al., 2007). Questa ricostruzione tridimensionale può considerarsi un valido approccio per studi tossicologici e farmacologici su larga scala. Tuttavia, la morfologia dell'epitelio, l'espressione delle citocheratine e delle proteine di adesione coinvolte nel processo di differenziazione terminale risultano spesso differenti rispetto alla cute umana in vivo (Moharamzadeh et al., 2007). I modelli tridimensionali di cute psoriasica occupano una posizione intermedia tra le colture cellulari e i modelli animali. A differenza delle cellule in coltura, i modelli tridimensionali riescono a mimare diverse condizioni come

le variazioni di differenziazione cellulare e del metabolismo, caratteristiche che nella psoriasi sono alterate. Poiché i modelli tridimensionali escludono le influenze dei tessuti e degli organi circostanti, in alcuni studi, invece, sono preferibili i modelli basati sugli animali (Soboleva et al., 2014). I modelli sperimentali tridimensionali di psoriasi offrono una possibilità per studiare la malattia in condizioni controllate e sono utili per la valutazione dei parametri che sarebbero difficili da valutare in vivo (Soboleva et al., 2014). In particolare, molti di questi modelli sono molto utili per raggiungere una migliore comprensione dei meccanismi di segnalazione, per quantificare proteine specifiche, fattori pro-infiammatori non proteici e citochine suggerendo che questi modelli potrebbero essere degli ottimi strumenti per la valutazione dei composti bioattivi che possono avere ruoli attivi nella malattia (Fransson and Hammar, 1992; Fogh et al., 1993).

Un modello anatomico ideale di cute umana dovrebbe quindi essere composto non solo da una corretta stratificazione dei cheratinociti, ma anche da una membrana basale in grado di mantenere l'ancoraggio con la matrice extracellulare e interazioni epitelio-mesenchimali e da un adeguato substrato per la crescita cellulare. Un valido approccio sperimentale è quindi rappresentato dalle colture organotipiche tridimensionali di cute umana. Fino ad ora nessun modello tridimensionale è stato standardizzato per studiare gli effetti diretti di citochine pro-infiammatorie sull'epidermide umana, nonostante il loro ruolo chiave nell'insorgenza e progressione della placca psoriasica sia ampiamente dimostrato. Nel nostro laboratorio è stato messo a punto un modello di colture organotipiche che rappresenta un approccio efficace nella ricerca dermatologica di base poiché permette di riprodurre un microambiente psoriasico che, anche se solo per 72 ore, presenta alcune caratteristiche specifiche della malattia.

L'aggiunta di citochine esogene nel mezzo di coltura consente di estrapolare l'effetto diretto di tali fattori sui diversi citotipi dell'epidermide umana, principalmente cheratinociti e cellule di Langerhans, poiché i vasi linfatici e sanguigni non sono preservati e non possono quindi veicolare.

## SCOPO DEL LAVORO

Durante i tre anni del Corso di Dottorato in Scienze Morfologiche svolto nel *Laboratorio di Morfologia Strutturale e Ultrastutturale* (Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano) ho collaborato allo studio dell'effetto dell'esposizione acuta a TNF-alfa, IL-17 o IL-22, da sole o in associazione, in un modello tridimensionale di espianti di cute umana normale ottenuti da interventi di chirurgia plastica.

Per tale studio sono state utilizzate metodiche di microscopia ottica ed elettronica. Colorazioni istologiche e reazioni di immunofluorescenza indiretta hanno permesso la valutazione della localizzazione di specifiche proteine di membrana, citosoliche e nucleari.

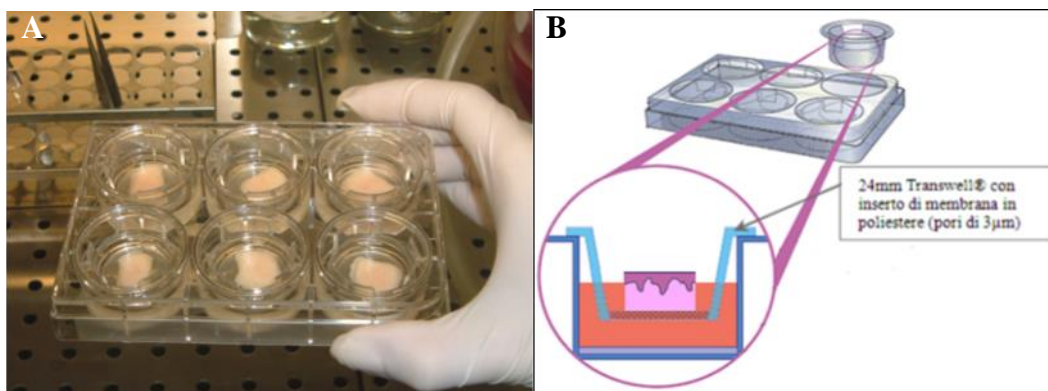
I parametri considerati sono riassunti qui di seguito:

- ✓ valutazione della **morfologia** strutturale del compartimento epidermico in microscopia ottica su sezioni in paraffina dopo colorazione con ematossilina/eosina;
- ✓ analisi dell'**ultrastruttura** dell'epidermide mediante analisi al microscopio elettronico a trasmissione;
- ✓ valutazione dell'omeostasi epiteliale mediante analisi quantitativa della **proliferazione cellulare** con reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina;
- ✓ espressione dei marker specifici di **differenziazione terminale** mediante reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina;
- ✓ espressione della **cheratina 17** (K17), considerata un marker psoriasico;
- ✓ espressione delle proteine coinvolte nell'**adesione intercellulare** tramite reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina;
- ✓ quantificazione, attraverso reazioni di immunofluorescenza indiretta su sezioni congelate, e morfologia ultrastrutturale delle **cellule di Langerhans epidermiche** mediante l'utilizzo del microscopio ottico ed elettronico a trasmissione.

## MATERIALI E METODI

### *Culture organotipiche ed esposizione a citochine pro-infiammatorie*

I frammenti biotipici sono stati ottenuti dopo interventi di chirurgia plastica di pazienti volontarie sane consenzienti e non fumatrici, con età compresa tra i 20 e 40 anni (n=7). Il trasporto al *Laboratorio di Morfologia Strutturale e Ultrastrutturale* presso il *Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute* è avvenuto in soluzione fisiologica attraverso l'utilizzo di contenitori sterili. Per ogni soggetto i frammenti di cute sono stati fissati subito dopo il prelievo (gruppo basale, B) e processati in parallelo per l'analisi in microscopia ottica ed elettronica. I restanti frammenti sono stati posizionati con il compartimento epiteliale rivolto verso l'alto ed esposto all'aria e il derma immerso nel medium di coltura in un sistema Transwell (Costar, Corning, NY, USA) (Figura 9 A e B) utilizzando medium di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Euroclone, Milano, Italia) con aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS; Invitrogen, Life Technologies Ltd., Paisley, UK) alla temperatura di 37° C in un incubatore umidificato (95% aria, 5% CO<sub>2</sub>) (Bedoni et al., 2007).



**Figura 9.** Fotografia (A) e rappresentazione schematica (B) del sistema Transwell® utilizzato nel Laboratorio di Morfologia Strutturale e Ultrastrutturale per la coltura di biopsie di cute umana normale. Le biopsie sono collocate sulla membrana di poliestere del pozzetto con il compartimento epiteliale verso l'alto esposto all'aria e il derma immerso nel terreno di coltura.

Al medium sono stati inoltre aggiunti:

- ✓ una soluzione di penicillina e streptomina (10 ml/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per inibire la crescita di batteri gram-positivi e gram-negativi;
- ✓ amfotericina B (3 mg/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per contrastare la crescita di funghi e lieviti;
- ✓ una soluzione di L-glutamina (20 ml/l) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), precursore dell'acido glutammico.

Non è stato aggiunto idrocortisone per evitare un'attività anti-infiammatoria sui cheratinociti epidermici. Il terreno, preparato secondo il protocollo appena descritto, è stato cambiato ogni giorno e lo strato corneo è stato mantenuto esposto all'aria. Prima di iniziare l'esperimento, le biopsie sono state incubate per una notte al fine di ridurre al minimo gli effetti acuti successivi all'intervento chirurgico. I campioni sono stati valutati a diversi time points: 24, 48 ore e 72 ore. Per lo stimolo pro-infiammatorio è stato aggiunto al medium di coltura TNF-alfa 100 ng/ml (Kirschner et al., 2009; Fujiwara et al., 2012) oppure IL-17 50 ng/ml (Gutowska-Owsiak et al., 2012), oppure IL-22 100 ng/ml (Zhang et al., 2012) o una miscela delle tre citochine (TNF-alfa 100 ng/ml, IL-17 50 ng/ml e IL-22 100 ng/ml) e i frammenti sono rimasti in coltura per 24, 48 e 72 ore. I frammenti biotici sono stati suddivisi in un gruppo controllo incubato nel solo medium di coltura (T24, T48 o T72), un gruppo trattato con TNF-alfa (T24 TNF-alfa, T48 TNF-alfa o T72 TNF-alfa), un gruppo trattato con IL-17 (T24 IL-17, T48 IL-17 o T72 IL-17) e un gruppo trattato con IL-22 (T24 IL-22, T48 IL-22 o T72 IL-22). La risposta epidermica è stata inoltre valutata dopo incubazione in un medium di coltura contenente una combinazione delle tre citochine pro-infiammatorie (T24 Tripla, T48 Tripla o T72 Tripla), al fine di evidenziare un potenziale effetto sinergico sul compartimento epidermico. Per valutare il grado di proliferazione cellulare, tre ore prima della fine di ciascun tempo sperimentale, il terreno di coltura è stato sostituito con terreno fresco contenente 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) ad una concentrazione di 400  $\mu$ M. La BrdU è un analogo non radioattivo della timidina che è selettivamente incorporata nel DNA delle cellule in attiva replicazione (fase S del ciclo cellulare) ed è quindi usato come marker esogeno di proliferazione cellulare. Ciascun soggetto è stato rappresentato in tutti i gruppi ed a tutti i tempi sperimentali. Al termine di ciascun tempo sperimentale i campioni sono stati processati parallelamente per la microscopia ottica ed elettronica a trasmissione.

## ***Allestimento dei campioni per l'analisi isto-morfologica***

Il processo di allestimento dei preparati istologici per l'analisi morfologica prevede diverse fasi che possono essere così schematizzate:

- ✓ riduzione;
- ✓ fissazione e lavaggio;
- ✓ disidratazione;
- ✓ chiarificazione;
- ✓ infiltrazione in paraffina;
- ✓ inclusione;
- ✓ taglio;
- ✓ colorazione.

Scopo finale è quello di ottenere un campione sufficientemente resistente al taglio e quindi incluso in un mezzo idoneo, nel nostro caso la paraffina, una miscela di idrocarburi altamente idrofoba. È quindi necessario eliminare dal campione tutta l'acqua presente e sostituirla con solventi idrofobi. La riduzione è necessaria al fine di ottenere campioni di dimensioni idonee (circa 1 cm<sup>3</sup>) alle successive analisi effettuate mediante microscopia ottica.

La fissazione è un processo necessario per bloccare la decomposizione del campione, poiché tutti i tessuti una volta asportati perdono rapidamente le loro proprietà chimiche e fisiche, a causa delle variazioni di pH e temperatura, e per l'azione di enzimi che degradano il materiale biologico. La fissazione determina l'inattivazione di tali enzimi autolisanti ed è quindi necessaria per conferire stabilità strutturale ai costituenti chimici del citoplasma. Esistono due tipi di fissazione: la fissazione fisica ottenuta mediante congelamento con azoto liquido o ghiaccio secco, il cui limite è quello di preservare poco la morfologia strutturale dei tessuti, e la fissazione chimica in cui si usano fissativi primari (coagulanti o non coagulanti) o miscele, ossia sostanze che formano legami stabili con il tessuto. Normalmente si tratta di soluzioni isotoniche a pH fisiologico in modo da evitare shock osmotici al campione. Le sostanze fissative pure sono normalmente diluite, a concentrazioni variabili in base al campione da fissare, in soluzioni tampone ossia miscele di soluti che impediscono significative variazioni di pH per aggiunta di modeste quantità di acidi o basi.

La scelta del fissativo varia in base alle dimensioni del campione, alla natura dei costituenti chimici cellulari e alla preservazione strutturale richiesta. I tempi di permanenza del materiale biotico nel fissativo e le concentrazioni del fissativo stesso dipendono dalle caratteristiche del campione e dalle sue dimensioni.

I nostri frammenti di cute sono stati fissati per 5 ore a temperatura ambiente in paraformaldeide al 4% in PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,1 M pH 7.4 su piastra agitante. Immergendo i campioni nella soluzione fissante si formano legami chimici stabili tra il gruppo aldeidico della formalina e il gruppo amminico delle proteine presenti nel tessuto.

Il lavaggio viene eseguito al termine della fissazione per eliminare eventuali residui ed eccessi di fissativo, che potrebbero interferire con le successive colorazioni e/o reazioni immunoistochimiche. Normalmente si utilizza lo stesso tampone usato per la diluizione del fissativo.

Nel nostro caso sono stati effettuati 3 lavaggi da 30 minuti ciascuno con PBS 0,1 M pH 7.4, a temperatura ambiente e in agitazione.

Il PBS è appunto il tampone da noi utilizzato sia per la diluizione del fissativo sia per i lavaggi e si prepara sciogliendo in un litro di acqua bidistillata le seguenti quantità di polveri:

- ✓ NaCl 5,3 gr;
- ✓ KCl 0,13 gr;
- ✓  $K_2PO_4$  0,13 gr;
- ✓  $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$  1,94 gr.

La disidratazione viene effettuata immergendo i campioni in etanolo a concentrazioni crescenti (70% - 96% - 100%) al fine di eliminare gradualmente l'acqua presente nei tessuti. In questo modo si evita l'eccessiva coartazione del tessuto e si modificano le sue proprietà chimiche rendendolo in grado di interagire con i solventi intermedi utilizzati prima dell'infiltrazione in paraffina.

La chiarificazione prevede l'immersione del tessuto disidratato in un intermedio miscibile con il successivo mezzo d'inclusione idrofobo (la paraffina). Nel nostro caso si utilizza lo xilolo, un solvente della paraffina, il quale si sostituisce all'etanolo aumentando il grado di idrofobicità dei tessuti. Questa fase è così definita poiché i frammenti bioptici assumono una colorazione biancastra estremamente chiara, diafana.

Sia la fase di disidratazione sia di chiarificazione, avvengono in agitazione per facilitare la penetrazione uniforme delle sostanze.

L'infiltrazione dei pezzi è stata realizzata immergendoli in paraffina liquida. La paraffina, ottenuta da residui della distillazione del petrolio, è il mezzo d'inclusione più utilizzato nell'allestimento dei campioni istologici. Ha la caratteristica di essere insolubile in acqua, ma di sciogliersi in solventi quali etere, xilolo, cloroformio. Dal punto di vista chimico consiste in una miscela di idrocarburi alifatici rispondenti alla formula generale  $C_nH_{2n+2}$  (con n compreso tra 21 e 34) e allo stato solido si presenta di colore bianco traslucido, inodore ed untuosa al tatto.

Fonde a temperature comprese tra i 45-60°C (quella da noi utilizzata ha una temperatura di fusione tra i 56-58°C).

Nelle nostre condizioni sperimentali il protocollo di disidratazione, di chiarificazione e d'infiltrazione in paraffina è stato il seguente:

- ✓ immersione in alcool 70% per una notte a 4°C;
- ✓ immersione per 30 minuti in alcool 96% (3 passaggi) a temperatura ambiente;
- ✓ immersione per 30 minuti in alcool 100% (3 passaggi) a temperatura ambiente;
- ✓ immersione per 30 minuti in xilolo (3 passaggi) a temperatura ambiente;
- ✓ immersione per 60 minuti in paraffina fusa (2 passaggi) a 60°C.

Terminate le diverse fasi di preparazione si procede con l'inclusione. I campioni sono posti singolarmente all'interno di vaschette metalliche (Figura 10) in cui è stata colata paraffina liquida e poste sopra una piastra riscaldata per evitare che la paraffina si solidifichi.

I frammenti sono posizionati con la superficie di taglio rivolta verso la base delle vaschette, una volta orientati nel modo migliore con pinzette metalliche riscaldate, si spostano le vaschette dalla piastra riscaldata ad una superficie a temperatura ambiente, così che un'iniziale solidificazione della paraffina fissi il pezzo nell'orientamento desiderato. A questo punto si posiziona un supporto di plastica, detto ring, (recante il nome del campione, il tipo di trattamento e il numero di blocchetto) (Figura 11) e si cola un'ulteriore quantità di paraffina così da ultimare la formazione del blocchetto di paraffina (Figura 12).

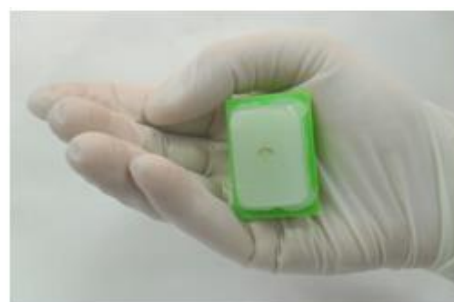
Infine i blocchetti così formati si lasciano solidificare a temperatura ambiente per una notte, al termine della quale è possibile rimuovere il supporto metallico ed estrarre il blocchetto pronto per il taglio. Qualora fosse necessario accelerare la procedura di raffreddamento è possibile avvalersi dell'ausilio di piastre raffreddanti oppure si ripongono i campioni in frigorifero dopo aver lasciato solidificare la paraffina per qualche minuto a temperatura ambiente.



**Figura 10.** Vaschetta



**Figura 11.** Ring



**Figura 12.** Blocchetto

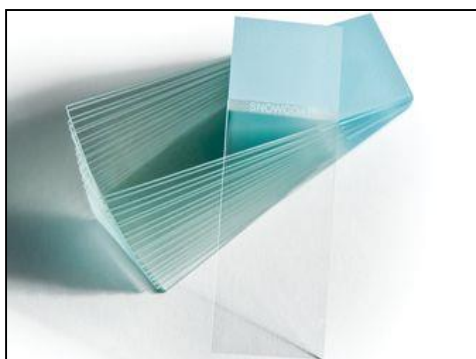


Nel caso in cui il pezzo non sia stato incluso correttamente (ovvero se il pezzo non sia stato orientato correttamente oppure se il blocchetto presenta bolle d'aria al suo interno) è necessario fondere nuovamente il blocchetto di paraffina appena modellato ponendolo in stufa, controllare l'orientamento del pezzo e colare dell'ulteriore paraffina fusa per formare un nuovo blocchetto.

Prima di procedere al taglio dei pezzi inclusi in paraffina mediante l'utilizzo di un microtomo, è stata effettuata la xilanizzazione dei vetrini. Scopo di questo processo è quello di conferire ai vetrini una carica elettrostatica, in modo da favorire l'adesione della sezione al vetrino (Figura 13).

Il processo di xilanizzazione prevede:

- ✓ immersione dei vetrini in soluzione di Contrad 2000 al 5% (un agente tensioattivo) in acqua distillata per 1 ora, per eliminare ogni impurità;
- ✓ risciacquo sotto acqua corrente per 3-4 ore;
- ✓ lavaggio in acqua distillata;
- ✓ asciugatura in stufa a 37°C;
- ✓ immersione dei vetrini in alcool 100%;
- ✓ asciugatura in stufa a 37°C;
- ✓ immersione dei vetrini nella soluzione 2% di 3-amminopropiltriectossisilano in acetone per 2 minuti;
- ✓ lavaggi continui con acqua distillata fino ad eliminare completamente l'eccesso di soluzione sulla superficie del vetrino;
- ✓ asciugatura dei vetrini in stufa a 37°C da 2 ore a tutta la notte;
- ✓ conservazione a temperatura ambiente.



**Figura 13.** Vetrini xilanizzati

Per iniziare il taglio, che ci permette di ottenere sezioni di spessore nell'ordine dei micrometri ( $\mu\text{m}$ ), è necessario ridurre adeguatamente la superficie di taglio del blocchetto, formando sul blocchetto una piramide dalle basi parallele, e posizionarlo sul supporto del microtomo a rotazione (Figura 14). Questo tipo di microtomo presenta un porta-lama fisso ed un porta-blocchetto che si muove verticalmente, azionato da una manovella posta di lato e comandata manualmente. Ad ogni corsa il blocco si sposta in avanti con uno spessore regolato in maniera digitale ed automatizzata. Nel nostro caso, abbiamo ottenuto sezioni dello spessore di  $4\ \mu\text{m}$ . Le fettine sono state poi adagiate per qualche minuto in una vaschetta riscaldata contenente acqua bidistillata per permettere la distensione della paraffina. A questo punto le sezioni sono state raccolte e poste sui vetrini xilanizzati, che in seguito sono stati lasciati in stufa per una notte in modo da permettere la completa asciugatura ed evitare la formazione di bolle. Da questo momento in poi tutto il lavoro è stato svolto sulle sezioni di cute aderite ai vetrini.



**Figura 14.** Microtomo a rotazione

Alcuni vetrini sono stati colorati per l'analisi istologica, mentre altri sono stati utilizzati per gli esperimenti d'immunofluorescenza per la rilevazione dell'incorporazione della BrdU e per l'analisi dell'espressione dei diversi biomarcatori epidermici. Considerando che i coloranti e gli anticorpi sono sempre in soluzione acquosa è stato necessario, prima di iniziare la colorazione o gli esperimenti d'immunofluorescenza, rimuovere il mezzo d'inclusione idrofobo, cioè la paraffina. Il primo passaggio da effettuare è quindi la sparaffinatura dei vetrini mediante immersione in xilolo. Alla sparaffinatura segue il processo di reidratazione del campione mediante l'immersione dei vetrini in soluzioni di etanolo a concentrazioni decrescenti; il passaggio diretto dall'etanolo assoluto all'acqua determinerebbe infatti un rigonfiamento troppo repentino delle cellule.

I passaggi sono i seguenti:

- ✓ 2 passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno;
- ✓ lavaggio in alcool 100% per 5 minuti;
- ✓ lavaggio in alcool 96% per 5 minuti;
- ✓ lavaggio in alcool 70% per 5 minuti;
- ✓ lavaggio in alcool 50% per 5 minuti;
- ✓ passaggio in acqua distillata per 5 minuti.

Al termine si può quindi procedere alla fase di colorazione vera e propria o agli esperimenti d'immunofluorescenza.

Una delle colorazioni d'insieme più comune, usata anche nelle nostre condizioni sperimentali, è l'ematossilina-eosina che prevede l'utilizzo di due coloranti acquosi per aumentare il contrasto tra i vari componenti del tessuto e ottenere un quadro generale della sua composizione.

L'ematossilina è un colorante naturale estratto dal legno di campeggio proveniente dall'America meridionale e dalle Indie. È un colorante basico, in grado quindi di legarsi alle componenti acide del campione, mettendo in evidenza i nuclei che si colorano di blu-violetto. L'ematossilina per legarsi ai tessuti deve essere combinata con delle sostanze chiamate mordenzanti, ovvero ioni metallici, quali sali di ferro, alluminio, tungsteno e piombo. In laboratorio abbiamo usato l'ematossilina di Gill, in soluzione commerciale (Bio-Optica, Milano, Italia) per 1 minuto. Terminato il passaggio in ematossilina, i vetrini mostravano un'intensa colorazione violacea molto diffusa. Per eliminare il colorante in eccesso e per garantire un'adeguata differenziazione del campione si procede mettendo i vetrini sotto l'acqua corrente sino a quando l'acqua non risulta limpida. Successivamente si effettua il passaggio in eosina, il colorante di contrasto d'elezione per l'ematossilina. L'eosina è un colorante artificiale che presenta caratteristiche acide e per questo si lega soprattutto alle strutture basiche del citoplasma conferendo una colorazione tipicamente rosata. In laboratorio abbiamo usato una soluzione acquosa allo 0,3% acidificata con 2 o 3 gocce di acido acetico glaciale per 1 minuto.

Mediante la combinazione dei due coloranti è possibile ottenere un quadro generale della composizione del tessuto. Il risultato finale è che i nuclei sono colorati in blu-viola ed il citoplasma si controcolora in arancione-rosa (Figura 15).



**Figura 15.** Microfotografia in campo chiaro di una sezione in paraffina di cute umana normale colorata con ematossilina-eosina. Barra=50  $\mu$ m.

Al termine del passaggio in eosina è necessario bloccare la colorazione effettuando i seguenti passaggi:

- ✓ passaggio veloce in acqua bidistillata;
- ✓ passaggio veloce in alcool al 50%;
- ✓ passaggio veloce in alcool al 70%;
- ✓ passaggio veloce in alcool 96%;
- ✓ passaggio veloce in alcool 100%.

Tutti i passaggi sono stati effettuati a temperatura ambiente. Prima di poter effettuare il montaggio del vetrino con una resina idrofoba diluita in xilolo sono stati eseguiti due passaggi in xilolo per 5 minuti ciascuno.

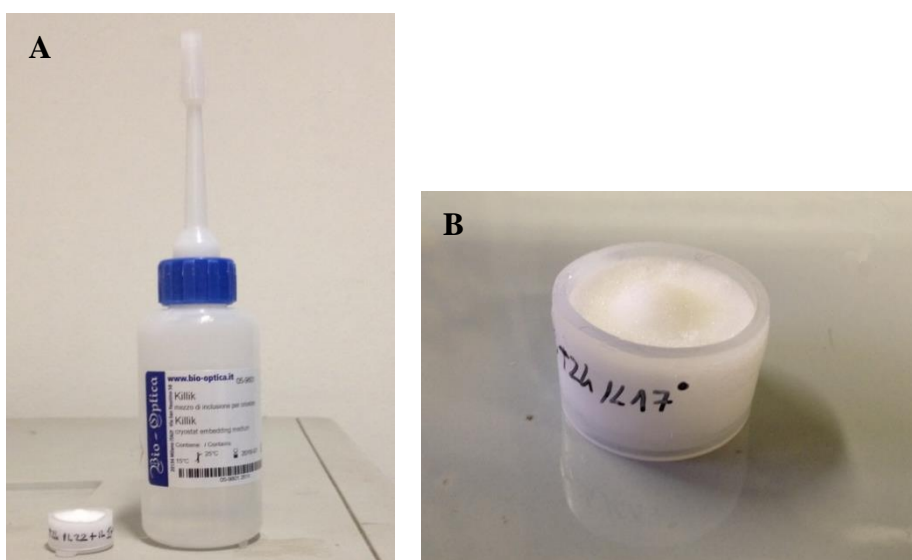
Il montaggio si effettua ponendo tra il vetrino porta-oggetto e il vetrino copri-oggetto una goccia di resina idrofoba, chiamata Entellan. Essa è una resina sintetica contenente xilolo che favorisce una rapida cristallizzazione impedendo l'interposizione d'aria tra i vetrini. Il montaggio ha lo scopo di garantire una migliore protezione alle sezioni e consentire una migliore osservazione delle stesse al microscopio ottico.

L'osservazione dei vetrini colorati con ematossilina-eosina è stata effettuata mediante un microscopio ottico Nikon Eclipse 80i collegato a una fotocamera digitale Nikon Ds-sMc (Nikon, Tokyo, Giappone) (Figura 16).



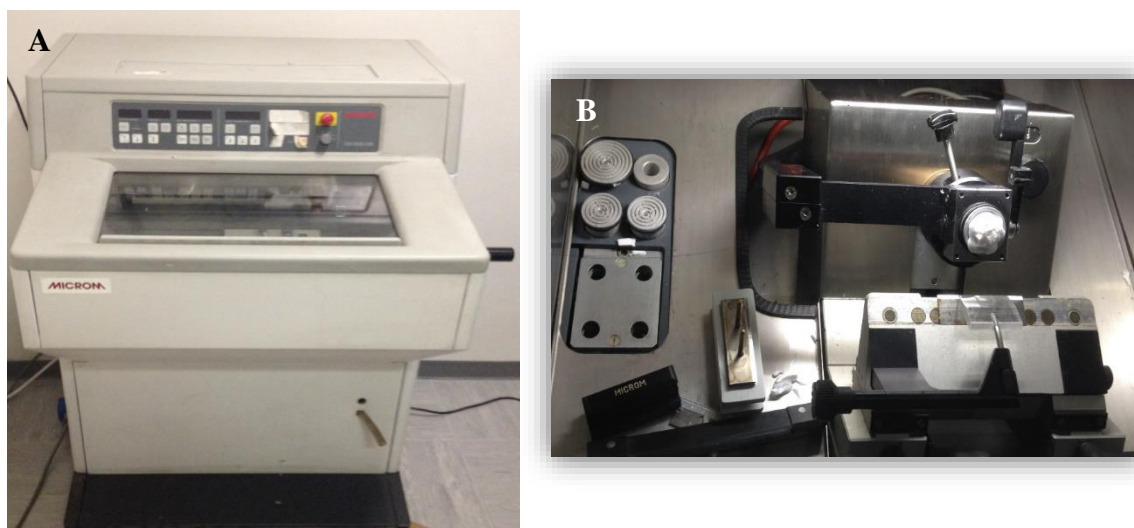
**Figura 16.** Microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i corredato con una fotocamera digitale Nikon DS-5Mc (Nikon, Tokyo, Giappone).

Parallelamente alla fissazione chimica in paraformaldeide al 4% e successiva inclusione in paraffina, altri campioni sono stati fissati per congelamento, inclusi in Optimal Cutting Temperature (OCT) (Bio-Optica, Milano, Italia) (Figura 17 A) e posti a  $-80^{\circ}\text{C}$ . L'OCT è una particolare resina che a temperatura ambiente presenta un aspetto e una consistenza gelatinosa, ma a partire dai  $4^{\circ}\text{C}$ - $5^{\circ}\text{C}$  tende a solidificare. Tale sostanza non penetra negli interstizi del tessuto, ma circonda il frammento, proteggendolo dal "trauma" del congelamento e costituendo inoltre un supporto solido necessario per il successivo taglio delle sezioni al criostato. La resina OCT è impiegata abitualmente nel congelamento dei frammenti da utilizzare successivamente per indagini di immunofluorescenza e immunoistochimica (Leonardo, 2011).



**Figura 17.** **A:** Optimal Cutting Temperature (OCT); **B:** Blocchetto con il campione congelato incluso in OCT.

La procedura consiste nel riempire dei tappini di plastica con OCT, al cui interno viene immerso e posizionato il campione di cute in modo che l'epidermide sia ben orientata e favorevole ad un eventuale fase successiva di taglio. Il campione incluso viene posto e conservato in freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 17 B).



**Figura 18. A:** criostato (HM 500, Microm, Zeiss); **B:** camera del criostato.

I campioni congelati vengono poi tagliati in sezioni sottili ( $4\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$ ) tramite uno strumento chiamato criostato (HM 500, Microm, Zeiss) (Figura 18 A) che viene utilizzato appositamente per tagliare campioni congelati di tessuto vegetale o animale.

La camera del criostato viene regolata a  $-37^{\circ}\text{C}$ ,  $-40^{\circ}\text{C}$  in modo che il pezzo incluso non scongeli. Il criostato è costituito da un porta-lama fissato allo stativo ed un porta-campione che si muove verticalmente azionato manualmente da una manovella posta a lato. Il campione congelato viene ridotto, incollato con l'OCT ad un supporto e in seguito posizionato nel braccio mobile del criostato (Figura 18 B). Ad ogni giro della manovella il braccio avanza dello spessore impostato dall'operatore in modo che il blocchetto venga a contatto con la lama e si ottengano le sezioni. Appoggiando delicatamente il vetrino xilanizzato sulla fetta questa aderisce velocemente per interazioni elettrostatiche. I vetrini con le sezioni così ottenute vengono conservati in freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al loro utilizzo.

## ***Analisi quantitativa della proliferazione cellulare***

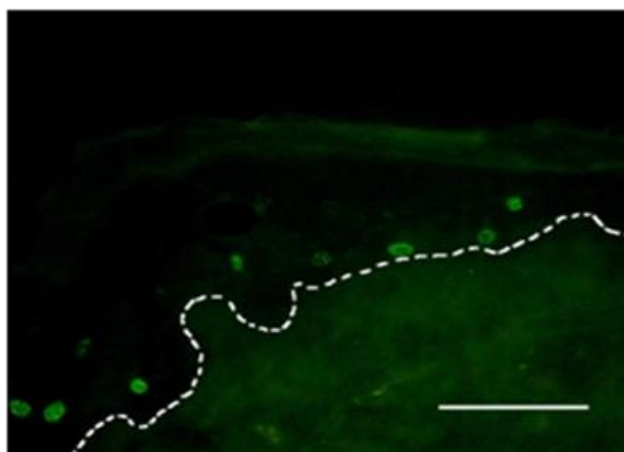
Per valutare il grado di **proliferazione cellulare**, abbiamo utilizzato una metodica precedentemente messa a punto nel nostro laboratorio in un modello sperimentale di colture organotipiche di cute (Donetti et al., 2005; Bedoni et al., 2007) e mucosa orale umana normale (Donetti et al., 2009). La rivelazione dell'incorporazione dell'analogo non radioattivo della timidina, la 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU), nelle cellule in attiva replicazione (fase S del ciclo cellulare) è stata effettuata tramite reazioni di immunofluorescenza indiretta che permettono di localizzare e quantificare la proliferazione dei cheratinociti nella sezione istologica analizzata.

Le cellule che hanno incorporato la BrdU sono state identificate utilizzando uno specifico anticorpo monoclonale prodotto da un ibridoma generato dalla fusione di una linea cellulare di plasmacitoma con le cellule immunitarie di un topo a cui era stato iniettato un coniugato di BrdU-ovoalbumina. Questo anticorpo è particolarmente specifico ed è stato dimostrato che non reagisce con la timidina (Gratzner, 1982; Bedoni et al., 2007).

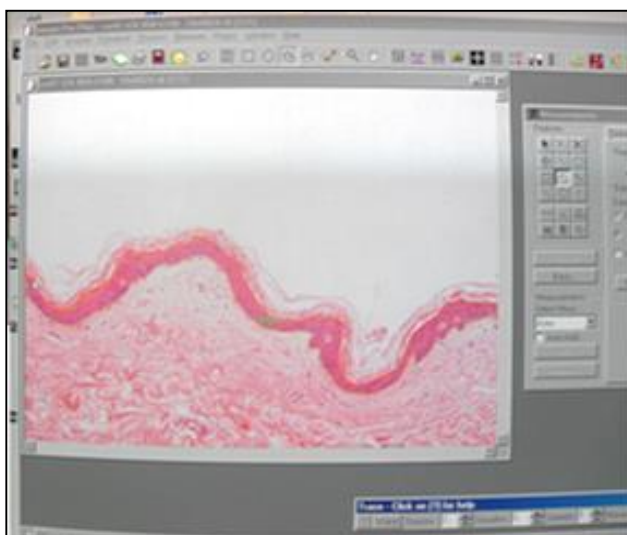
Le sezioni in paraffina sparaffinate e reidratate, sono state immerse in acido cloridrico (HCl) 2N per indurre l'apertura della doppia elica di DNA. Dopo aver ridotto l'acidità determinata dall'HCl con tetraborato di sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 0,1M, il trattamento con pepsina 0,05% pH 1.5 per 25 minuti a 37°C ha permesso di rompere i legami crociati formati fra le proteine tissutali ed il fissativo che potrebbero impedire il riconoscimento antigene-anticorpo. Le sezioni sono state poi incubate con un anticorpo monoclonale specifico per il DNA di cellule che hanno incorporato la BrdU (mouse anti human BrdU - Novocastra) diluito 1:200 per 60 minuti a temperatura ambiente e successivamente rivelato grazie a un anticorpo secondario goat anti-mouse coniugato FITC (fluorescein isothiocyanate - Jackson Immunoresearch) diluito 1:200 e incubato per 60 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata effettuata in doppio (due vetrini per ciascun campione) ed in presenza di un controllo positivo, ossia almeno un campione su cui la reazione era già stata effettuata in precedenza con esito positivo. Nelle sezioni incubate con l'anticorpo primario anti-BrdU, a livello dello strato basale sono visibili cellule con un'evidente marcatura puntiforme nucleare (Figura 19), cioè le cellule proliferanti che hanno incorporato la BrdU.

Indice della specificità della reazione è l'assenza di cellule marcate sulle sezioni negative che non sono state incubate con l'anticorpo primario. Due operatori in doppio cieco hanno contato le cellule positive alla BrdU, cioè quelle in attiva proliferazione. Il numero ottenuto è stato normalizzato rispetto all'area complessiva di cute, ad esclusione dello strato corneo, calcolata grazie al software di analisi d'immagine (Image Pro Plus version 4.5.019; Media

Cybernetics Inc; Maryland, USA Media Cybernetics Inc; Maryland, USA). Tale programma permette il calcolo dell'area di epitelio vitale selezionata manualmente da un operatore su immagini digitali da noi ottenute con microscopio ottico Nikon Eclipse 80i collegato alla fotocamera digitale Nikon Ds-5Mc (Nikon) a ingrandimento 10x dalle sezioni adiacenti a quelle utilizzate per la reazione di immunofluorescenza e colorate con ematossilina-eosina (Figura 20). L'operazione di normalizzazione è necessaria al fine di evitare un'errata stima della proliferazione cellulare, che viene infine espressa come numero di cellule positive alla BrdU per  $\text{mm}^2$  di epitelio vitale.



**Figura 19.** Microfotografia di sezione in paraffina di cute umana normale dopo immunofluorescenza con anti BrdU. La linea tratteggiata indica la membrana basale. Barra=50 $\mu\text{m}$ .



**Figura 20.** Calcolo delle aree con Image Pro Plus version 4.5.019.



## ***Analisi qualitativa di markers epidermici in immunofluorescenza***

Eventuali alterazioni nel processo di **differentiazione terminale** dei cheratinociti sono state messe in luce con esperimenti di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina, utilizzando anticorpi specifici per le isoforme K10, K14 e K17. I protocolli seguiti per l'analisi qualitativa della differenziazione terminale sono riassunti nella Tabella 1.

**Tabella 1:**

SEZIONI IN PARAFFINA				
Anticorpo primario	Saturazione dei siti aspecifici	Smascheramento antigenico e/o enzimatico	Diluizione/ Tempo incubazione	Anticorpo secondario
<b>DIFFERENZIAZIONE TERMINALE</b>				
<b>K10</b>  (Keratin 10 - Progen Biotechnik )	Goat Serum (Vector) 1:10/ 30' TA	microonde (750w) ebollizione 3 x 4"	1:10/ overnight 4°C	Goat anti-mouse coniugato FITC (Jackson) 1:200/ 1 h TA
<b>K14</b>  (Keratin 14 - Santa Cruz)	Goat Serum (Vector) 1:10/ 30' TA	microonde (750w) ebollizione 3 x 4" + pepsina 0,05% 15' TA	1:200/ overnight 4°C	
<b>K17</b>  (Keratin 17- Santa Cruz)	Goat Serum (Vector) 1:10 1 h TA	autoclave 10' 120°C	1:500/ overnight 4°C	Goat anti-rabbit coniugato FITC (Santa Cruz) 1:200/ 1 h TA

Per valutare eventuali alterazioni **a livello delle giunzioni epidermiche** sono stati effettuati esperimenti di immunofluorescenza indiretta su sezioni in paraffina, utilizzando anticorpi specifici per la Dsc1, la E-caderina, l'occludina e la filaggrina. I protocolli seguiti per l'analisi qualitativa dell'adesione intercellulare sono riassunti nella Tabella 2.

**Tabella 2:**

SEZIONI IN PARAFFINA				
Anticorpo primario	Saturazione dei siti aspecifici	Smascheramento antigenico e/o enzimatico	Diluizione/ Tempo incubazione	Anticorpo secondario
<b>ADESIONE INTERCELLULARE</b>	Goat Serum (Vector) 1:10/ 30' TA	microonde (750w) ebollizione 3 x 4" + pepsina 0,001% 15' 37°C	prediluito/ 1 h TA	Goat anti-mouse coniugato FITC (Jackson) 1:200/ 1 h TA
<b>Dsc1</b> (Desmocollina1 - Progen)				
<b>E-caderina</b> (36/E-Cadherin - BD Bioscience)	Goat Serum (Vector) 1:10/ 45' TA	Autoclave 10' 120°C	1:1000/ overnight 4°C	
<b>Occludina</b> (Occludin - Invitrogen)	Goat Serum (Vector) 1:10 45' TA	microonde (750w) ebollizione 3 x 1' + pepsina 0,001% 15' 37°C	1:100/ overnight 4°C	Goat anti-rabbit coniugato FITC (Santa Cruz) 1:200/ 1 h TA
<b>Filaggrina</b> (FLG - Santa Cruz)	Goat Serum (Vector) 1:10/ 30' TA	microonde (750w) ebollizione 2 x 20''	1:2500/ overnight 4°C	

In tutti gli esperimenti, le sezioni in paraffina sono sparaffinate, reidratate attraverso una scala discendente di etanoli, trattate per lo smascheramento antigenico e la saturazione dei siti aspecifici prima dell'incubazione con lo specifico anticorpo primario e secondario.

I nuclei sono stati contrastati con 4', 6-diamidino-2-fenilindolo diidrocloreuro (DAPI) per la colorazione nucleare effettuando una incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente (TA). Una sezione per ciascun vetrino è stata utilizzata come controllo tecnico negativo in cui l'anticorpo primario è stato omesso e sostituito con PBS 0,1M (pH 7.4).

### ***Analisi quantitativa delle cellule di Langerhans***

Per l'immunolocalizzazione/quantificazione delle cellule di Langerhans su sezioni congelate di pelle, i campioni sono stati posti per 10 minuti a temperatura ambiente e poi fissati per immersione in acetone freddo per 10 minuti a -20°C. Le sezioni sono state poi lasciate asciugare all'aria, lavate con PBS 0,1 M (pH 7.4) per tre volte per 5 minuti ciascuno e poi incubate con PBS/Bovine Serum Albumine (BSA) 2% per 60 minuti per bloccare i siti di legame aspecifici. Come anticorpo primario monoclonale è stata usata la Langerina (Mouse anti-human Langerin; Immunotech, Francia) ad una diluizione di 1:100 in PBS-BSA 0,5% per 120 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state successivamente lavate con lo stesso tampone per tre volte per 5 minuti ciascuno e poi incubate con l'anticorpo secondario coniugato TRITC (Goat anti-mouse; Jackson ImmunoResearch, Baltimora, USA) diluito 1:100 in PBS-BSA 0,5% per 60 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi in PBS-BSA 0,5%, le sezioni sono state incubate con DAPI diluito 1:50000 in PBS 0,1 M (pH 7.4) per 5 minuti a temperatura ambiente per colorare i nuclei e poi lavate con H<sub>2</sub>O per 10 minuti. Le sezioni sono state montate con Mowiol 4-88 (Calbiochem, La Jolla, CA). Controlli tecnici negativi sono stati trattati come descritto sopra, ma l'anticorpo primario è stato omesso e sostituito con PBS-BSA 0,5%.

Per l'analisi quantitativa delle cellule di Langerhans sono stati eseguiti almeno tre esperimenti di immunofluorescenza per ciascun campione, con due vetrini per campione e non meno di due sezioni su ogni vetrino. Due investigatori in doppio cieco hanno contato i corpi cellulari delle cellule di Langerhans Langerina-positivi localizzati nell'epidermide con un obiettivo 40x. I risultati sono stati espressi come percentuale del numero di cellule di Langerhans per mm<sup>2</sup> di epidermide vitale + 1 deviazione standard, considerando il controllo come 100%. Per normalizzare la conta effettuata in immunofluorescenza, l'area dell'epidermide è stata calcolata sulle sezioni di ematossilina/eosina adiacenti, escludendo lo strato corneo. Per la misura dell'area è stato utilizzato il software Image Pro-Plus (versione

4.5.019; Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD, USA) sfruttando una procedura già standardizzata (Donetti et al., 2005) e precedentemente descritta in relazione all'analisi quantitativa della proliferazione cellulare.

### ***Processazione dei campioni per l'analisi ultrastrutturale***

Per valutare l'aspetto morfologico ultrastrutturale dei campioni, alcuni frammenti bioptici (2x2 mm) sono stati fissati per immersione con una soluzione di glutaraldeide al 3% diluita in tampone fosfato di Sorensen 0,1M (pH 7.4) overnight a 4°C. Dopo una notte di fissazione i campioni sono stati lavati ripetutamente con tampone fosfato di Sorensen (3 lavaggi da 30 minuti ciascuno) e successivamente post-fissati in tetrossido di osmio 1%. In seguito alla disidratazione con una scala ascendente di etanoli, i campioni sono stati inclusi in una resina epossidica idrofoba (Araldite; Fluka, Milano, Italia). Le sezioni semifini (2 µm) sono state colorate con blu di toluidina. Le sezioni fini (70 nm) sono state ottenute con un ultramicrotomo (Leica, Wien, Austria), colorate con acetato di uranile e citrato di piombo e successivamente osservate al microscopio elettronico a trasmissione (Jeol CX100, Tokyo, Giappone). Per ciascun gruppo sperimentale sono state osservate almeno 30 cellule.



**Figura 21.** Microscopio elettronico a trasmissione (Jeol CX100, Tokyo, Giappone).

## RISULTATI

### *Analisi istologica*

L'osservazione al microscopio ottico in campo chiaro delle sezioni in paraffina colorate con ematossilina eosina ci ha permesso di affermare che la struttura tridimensionale di tutti i campioni di cute è mantenuta. L'analisi comparata fra le sezioni relative a biopsie di controllo e quelle esposte a citochine infiammatorie ha evidenziato in tutti i gruppi sperimentali la presenza di un monostrato ben conservato di cheratinociti basali accompagnati dalla presenza di melanociti (Figura 22).

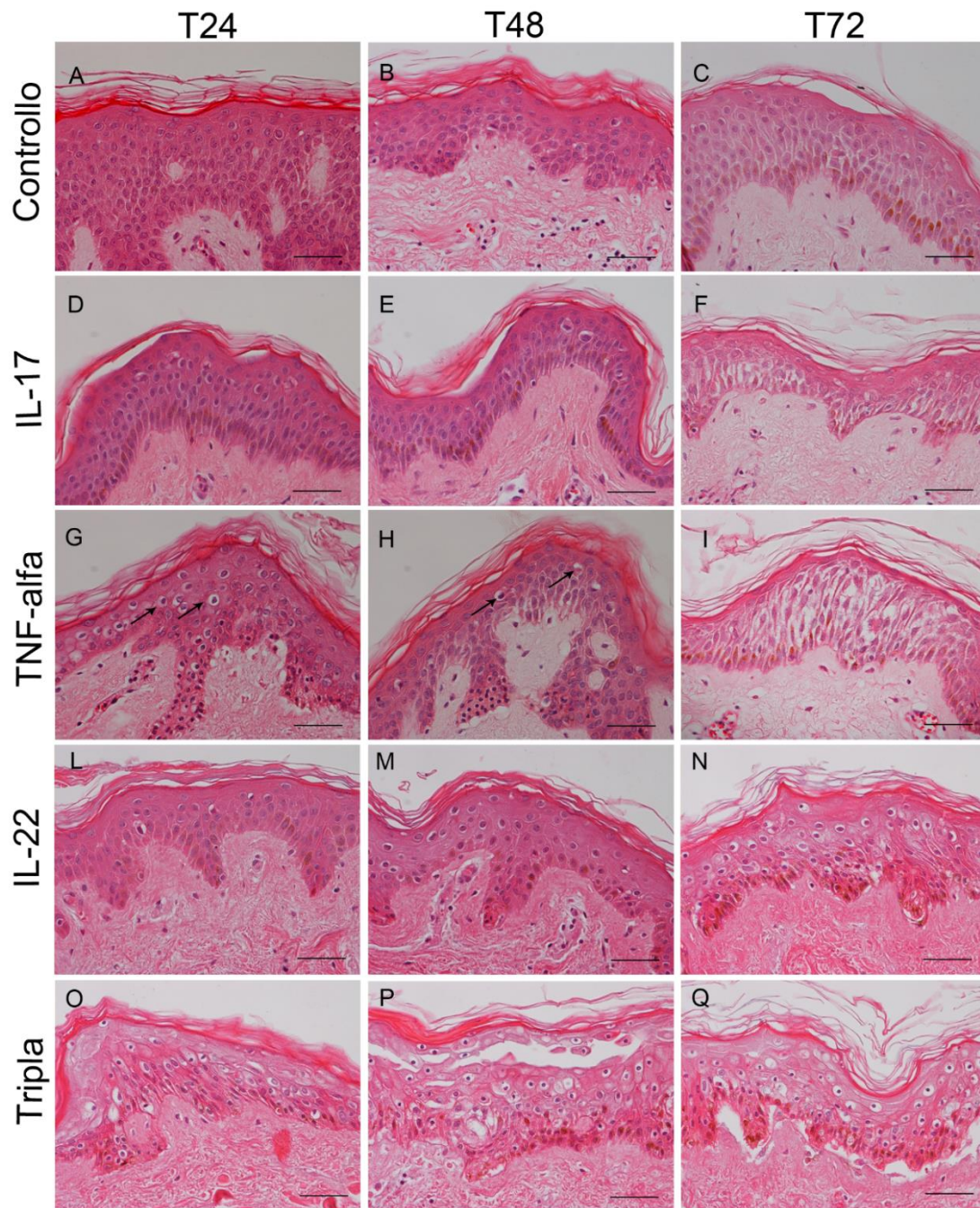
Non abbiamo osservato differenze tra i campioni immediatamente processati dopo la chirurgia ed i campioni controllo processati 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight (Figura 22 A-C).

I campioni che sono stati incubati per 24 o 48 ore con IL-17 mostrano la presenza di alcuni nuclei picnotici negli strati soprabasali ed una lieve dilatazione degli spazi intercellulari a livello dello strato spinoso (Figura 22 D e E). Queste dilatazioni sono più evidenti e diffuse in tutti gli strati dell'epidermide nei campioni che sono stati incubati con IL-17 per 72 ore (Figura 22 F).

L'esposizione a TNF-alfa per 24 o 48 ore determina la presenza di cheratinociti con citoplasma pallido e nuclei condensati nello strato spinoso (Figura 22 G e H, frecce). Dopo 72 ore di coltura con TNF-alfa si osserva una notevole dilatazione degli spazi intercellulari in tutti gli strati epidermici (Figura 22 I).

I campioni che sono stati incubati per 24 e 48 ore con IL-22 mostrano una morfologia paragonabile ai campioni controllo (Figura 22 L e M); al contrario dopo 72 ore di esposizione ad IL-22 si osserva la presenza di numerosi nuclei picnotici in tutti gli strati epidermici ed un iniziale distacco fra derma ed epidermide (Figura 22 N).

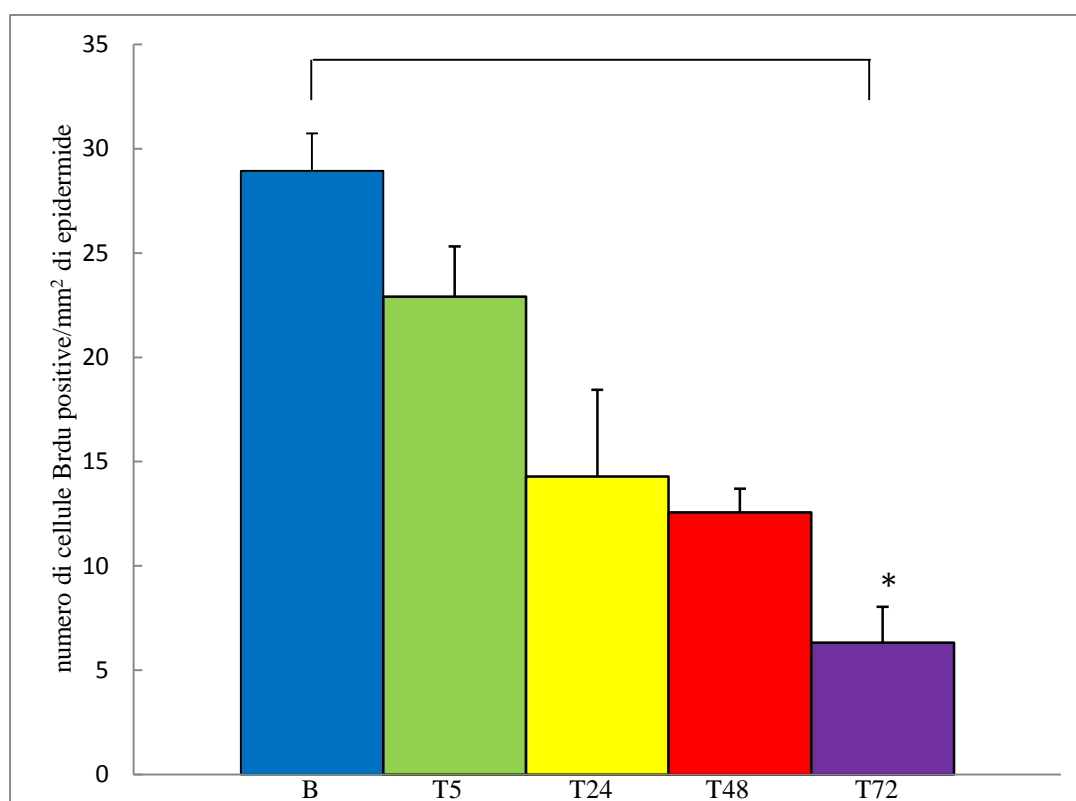
L'esposizione combinata alle tre citochine infiammatorie (Tripla) determina notevoli alterazioni morfologiche già a partire dalle 24 ore di coltura e tali modificazioni aumentano con il proseguire del tempo di incubazione (Figura 22 O e P). In particolare dopo 72 di esposizione alle tre citochine infiammatorie si osserva un evidente distacco fra derma ed epidermide, oltre alla presenza di diffusi cheratinociti con nuclei condensati (Figura 22 Q).



**Figura 22.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale colorate con ematossilina ed eosina. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. Le frecce nere indicano i cheratinociti nello strato spinoso con citoplasma pallido e nuclei condensati. IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22. Barre= 50  $\mu$ m.

## ***Proliferazione cellulare***

I risultati sono stati espressi come numero di nuclei positivi alla BrdU normalizzato per unità di area di epidermide vitale considerata. Dalla Figura 23 si osserva una progressiva riduzione della proliferazione epidermica passando dal gruppo basale (B) a quello mantenuto in coltura per tutta la notte e fissato 5 ore (T5) dopo il termine dell'incubazione overnight. Ciò è dovuto a una riduzione dello stress meccanico e termico a cui sono sottoposti i campioni a seguito dell'intervento chirurgico. I campioni controllo mantenuti in coltura per 24 (T24) e 48 (T48) ore hanno mostrato una proliferazione cellulare simile. A 72 ore (T72) si evidenziano solo poche sparse cellule proliferanti, ma l'epidermide risulta ancora vitale.

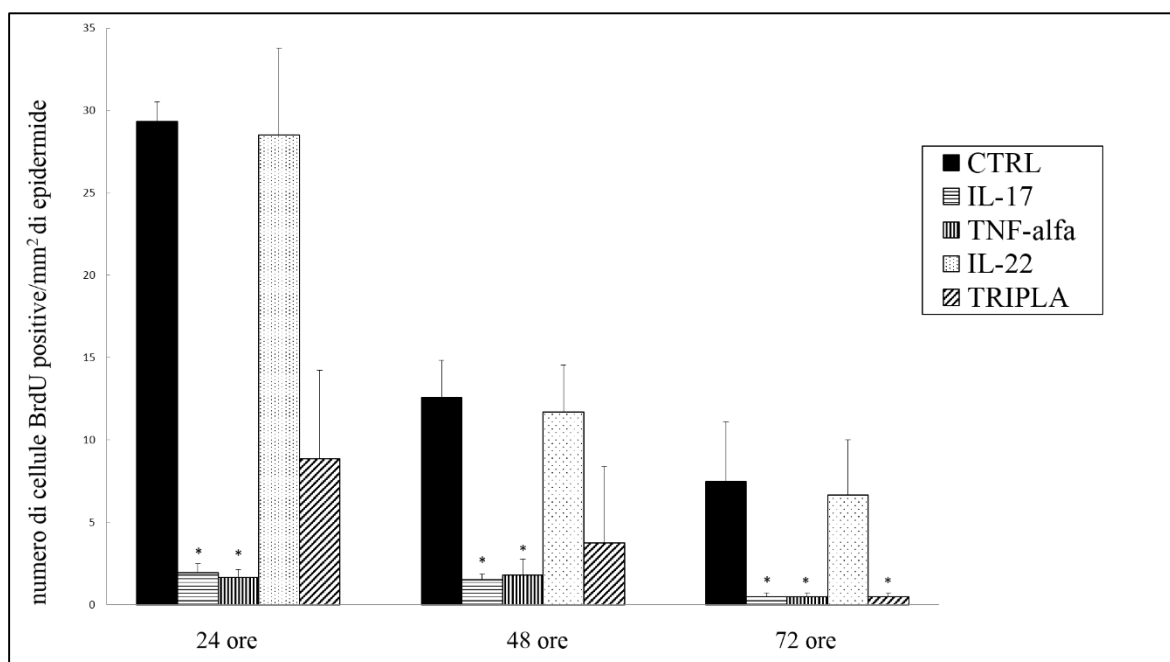


**Figura 23.** Analisi quantitativa della proliferazione cellulare di campioni controllo analizzati 5, 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I risultati sono espressi come numero di cellule BrdU positive/mm<sup>2</sup> di epidermide vitale + 1 deviazione standard. \* =  $p < 0.05$  dopo analisi statistica con test di Wilcoxon per campioni appaiati rispetto ai controlli. BrdU: 5-Bromo-2'-deossiuridina; B: campioni controllo fissati subito dopo il prelievo; T5: campioni controllo fissati dopo 5 ore di coltura; T24: campioni controllo fissati dopo 24 ore di coltura; T48: campioni controllo fissati dopo 48 ore di coltura; T72: campioni controllo fissati dopo 72 ore di coltura.

Sulla base di questa prima serie di esperimenti si è scelto di valutare a T24, T48 e T72 l'effetto sulla proliferazione cellulare di IL-17, TNF-alfa e IL-22 sia singolarmente sia in associazione (Tripla) (Figura 24).

L'esposizione per 24 o 48 ore a IL-17 o a TNF-alfa singolarmente determina una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ , test di Wilcoxon; test non parametrico per valori appaiati) della proliferazione cellulare se confrontata con i rispettivi controlli. Dopo 72 ore di esposizione la proliferazione cellulare è quasi nulla.

IL-22 a 24 e 48 ore non determina una diminuzione della proliferazione epidermica rispetto ai rispettivi campioni controllo. Solo dopo 72 ore di incubazione con IL-22 si osserva una lieve riduzione non statisticamente significativa della proliferazione cellulare se confrontata con il relativo controllo. A tutti i tempi sperimentali considerati è evidente un'inibizione statisticamente significativa del numero di cellule BrdU-positive/mm<sup>2</sup> di epidermide vitale dopo esposizione alla combinazione delle tre citochine ( $p < 0.05$ , test di Wilcoxon; test non parametrico per valori appaiati).



**Figura 24.** Analisi quantitativa della proliferazione cellulare di campioni incubati con diverse citochine infiammatorie 24, 48, 72 ore dopo l'incubazione overnight. CTRL: campioni controllo senza citochine aggiunte; IL-17: campioni trattati con IL-17; TNF-alfa: campioni trattati con TNF-alfa; IL-22: campioni trattati con IL-22; TRIPLA: campioni trattati con la combinazione di IL-22, IL-17 e TNF-alfa. I risultati sono stati espressi come numero di cellule BrdU-positive/mm<sup>2</sup> di epidermide vitale + 1 deviazione standard. \* =  $p < 0.05$  dopo analisi statistica con test di Wilcoxon per campioni appaiati rispetto ai controlli  
CTRL: controllo; IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: Tumor necrosis factor-alfa; IL-22: Interleuchina 22; BrdU: 5-bromo-2'deossiuridina.



## ***Analisi qualitativa di markers epidermici in immunofluorescenza***

I risultati degli esperimenti di immunofluorescenza mostrano come la K10, biomarker di differenziazione terminale degli strati soprabasali dell'epidermide umana normale, sia espressa in modo omogeneo nel compartimento epidermico nei campioni controllo a tutti i tempi sperimentali considerati (Figura 25 A-C). In tutti i campioni lo strato basale risulta sempre negativo per questo marker. Tale biomarker non risulta alterato in seguito al trattamento con IL-17 e TNF-alfa a nessun tempo preso in esame (Figura 25 D-I). Dopo esposizione ad IL-22, già a partire dalle 24 ore di incubazione, si possono osservare gruppi cheratinociti negativi per K10 a livello dello strato spinoso basso che risultano sempre più evidenti all'aumentare del tempo di coltura (Figura 25 L-N, asterischi). Nei campioni esposti all'associazione delle tre citochine (Tripla) si osserva una distribuzione disomogenea della K10 negli strati soprabasali (Figura 25 O-Q, asterischi).

La K14, espressa solo nello strato basale dell'epidermide, non risulta alterata in seguito al trattamento con IL-17 (Figura 26 D-F) e TNF-alfa (Figura 26 G-I) a nessun tempo sperimentale e paragonabile ai campioni controllo (Figura 26 A-C). La marcatura per la K14 appare disomogenea, con lievi interruzioni, a partire dalle 48 ore di coltura con IL-22 da sola (Figura 26 M-N, asterischi) o in associazione con le altre due citochine infiammatorie (Tripla) (Figura 26 P-Q, asterischi).

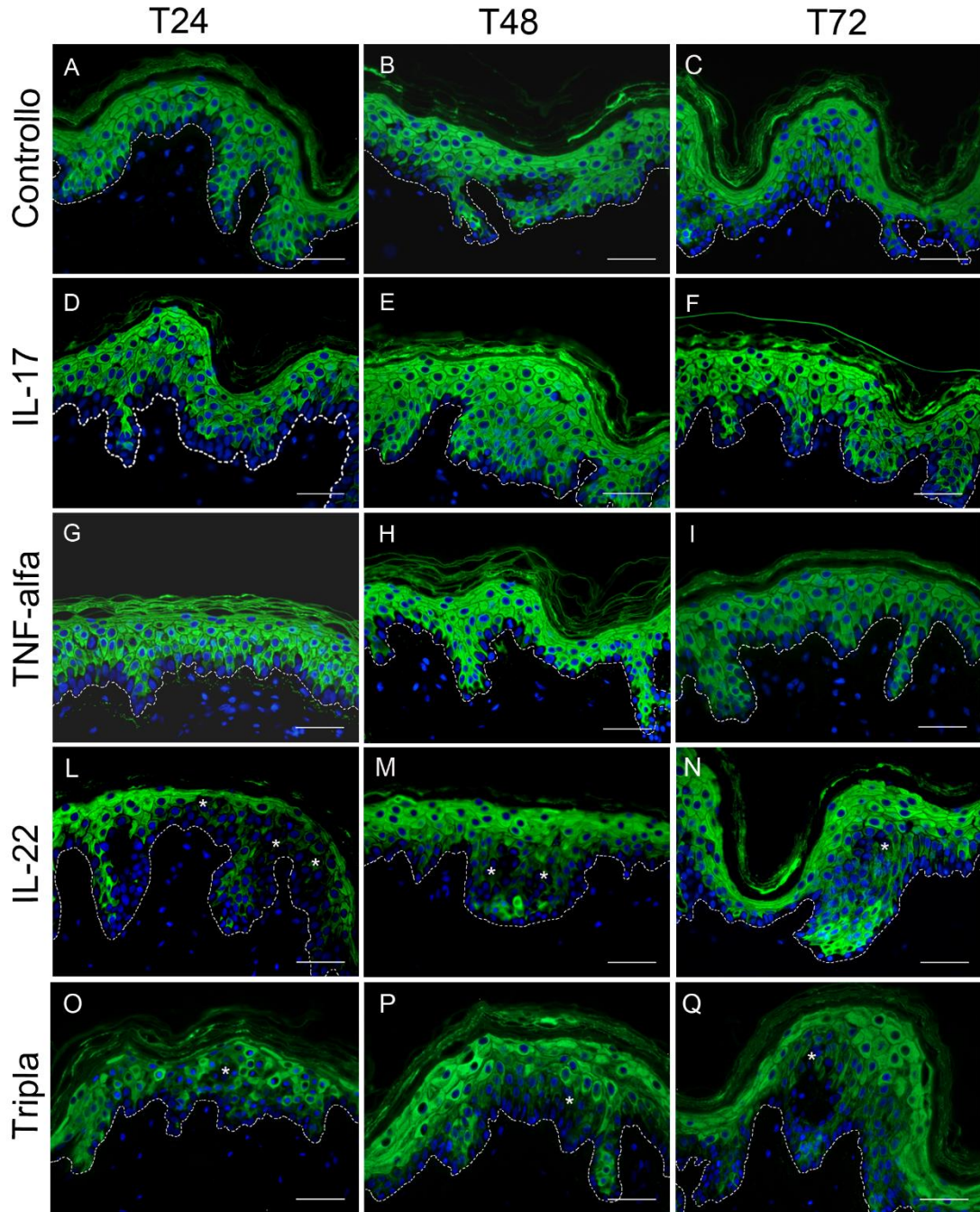
La K17 normalmente è assente nella cute sana, ma è espressa a livello citoplasmatico in tutti gli strati soprabasali ad eccezione dello strato corneo nei pazienti psoriasici. Infatti la marcatura è assente nei nostri campioni controllo (Figura 27 A-C). Dopo 24 ore di coltura, l'esposizione a IL-17 (Figura 27 D) e a IL-22 (Figura 27 L) induce l'espressione citoplasmatica della K17. Essa non appare omogeneamente distribuita in tutti gli strati soprabasali, ma l'immunoreattività tende ad aumentare con il tempo (Figura 27 E, F, M, N). Nei campioni trattati con TNF-alfa la marcatura per K17 è stata osservata solo in cheratinociti sparsi confinati agli strati soprabasali e tende a ridursi nel tempo (Figura 27 G-I). Nei campioni trattati con tutte e tre le citochine infiammatorie (Tripla) abbiamo osservato l'induzione dell'espressione della K17 in tutto lo strato spinoso. Con il procedere del tempo di coltura il numero di cellule K17-positive aumenta (Figura 27 O-Q).

Gli esperimenti d'immunofluorescenza per la caderina desmosomiale Dsc1 (Figura 28) e per la E-caderina (Figura 29) non hanno mostrato alcuna differenza nella distribuzione di questo antigene in seguito al trattamento con le citochine pro-infiammatorie a nessuno dei tempi sperimentali considerati. Per la Dsc1 le membrane citoplasmatiche di tutti i gruppi sperimentali sono risultate chiaramente marcate procedendo dallo strato spinoso più

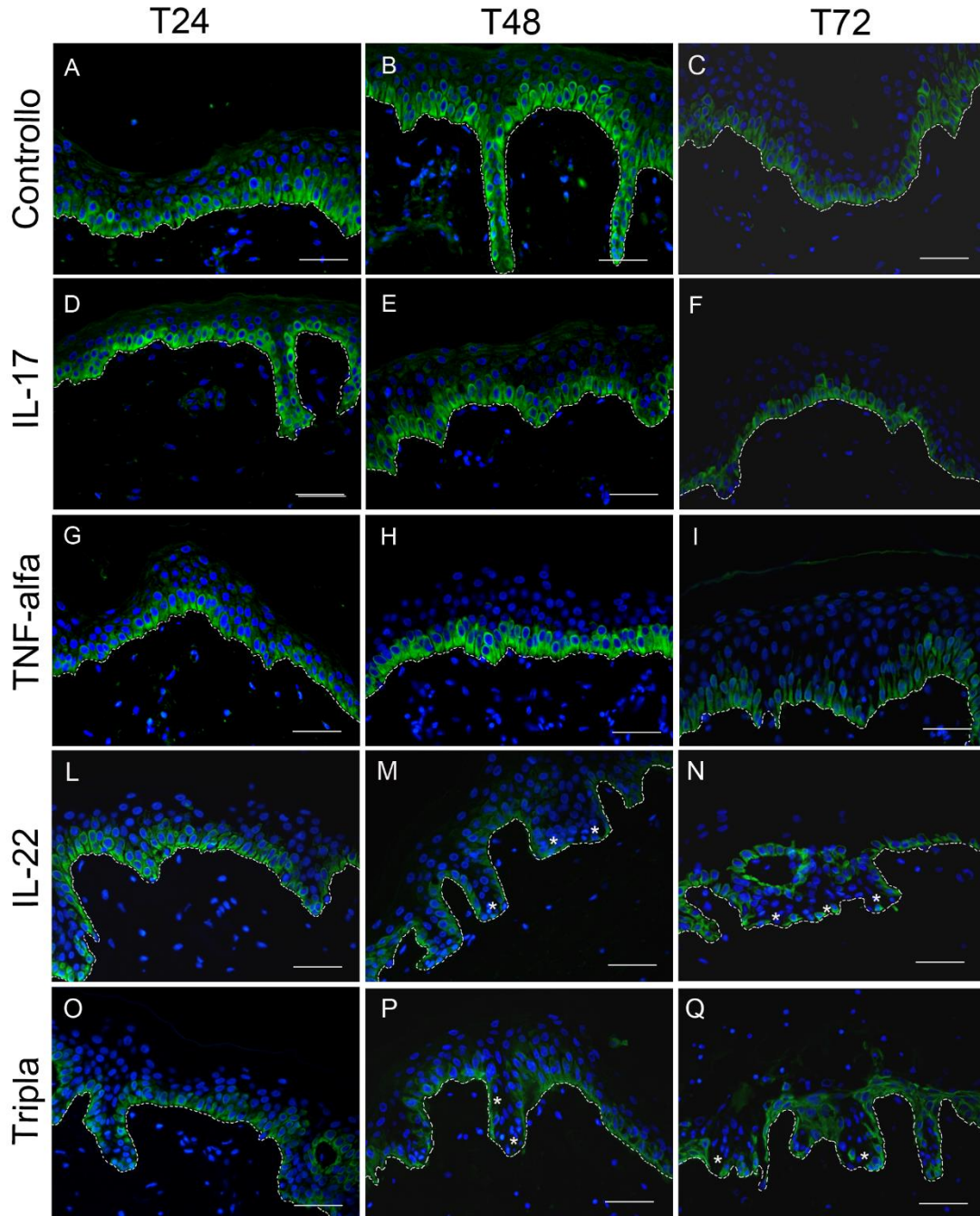
superficiale fino allo strato granuloso, ad esclusione dello strato corneo. La E-caderina, invece, è distribuita omogeneamente in tutto il compartimento epidermico.

La marcatura per l'occludina è localizzata nello strato granuloso dell'epidermide a livello delle giunzioni occludenti nei campioni controllo (Figura 30 A-C). A partire dalle 24 ore di esposizione a IL-17 (Figura 30 D-F, frecce bianche) e a TNF-alfa (Figura 30 G-I, frecce bianche), si osserva una discontinuità nell'espressione dell'occludina stessa, che risulta ancora più evidente in seguito ad incubazione con IL-22 (Figura 30 L-N, frecce bianche) o con la combinazione delle tre citochine (Tripla) (Figura 30 O-Q, frecce bianche).

La filaggrina è espressa a livello di membrana nello strato granuloso dell'epidermide nei campioni controllo a tutti i tempi sperimentali considerati (Figura 31 A-C). A partire da 48 ore di coltura, l'esposizione a IL-17 induce una lieve discontinuità dell'immunopositività per tale marcatore (Figura 31 D-F, frecce bianche). Nei campioni trattati con TNF-alfa si osserva una riduzione dell'intensità della marcatura già a partire da 24 ore di coltura (Figura 31 G-I). L'incubazione con IL-22 (Figura 31 L-M) o con l'associazione delle tre citochine (Tripla) (Figura 31 O-Q) non determina alcuna modificazione nell'espressione della filaggrina a nessuno time point considerato.

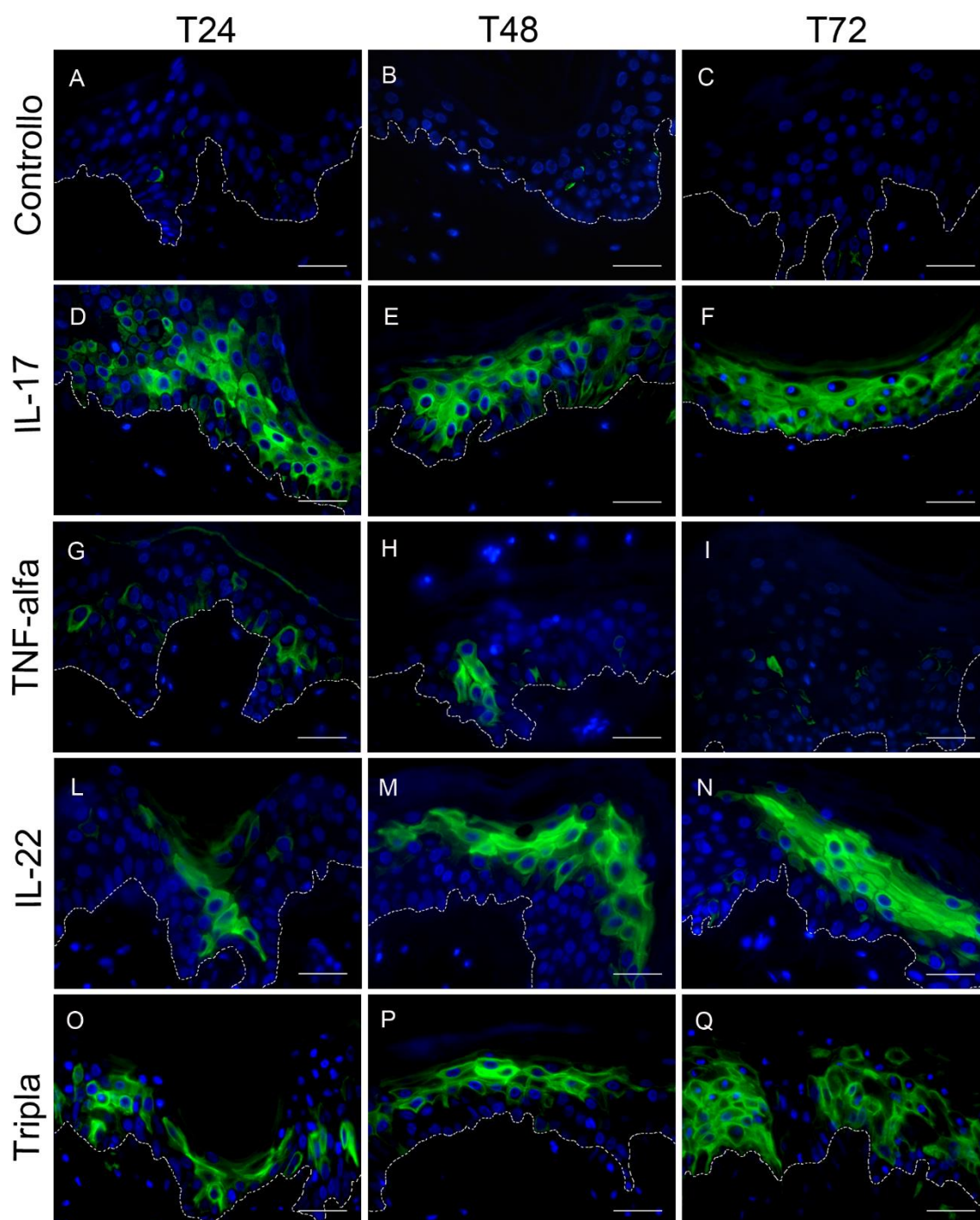


**Figura 25.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della K10. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Gli asterischi bianchi indicano alterazioni della marcatura. K10: citocheratina 10; IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.



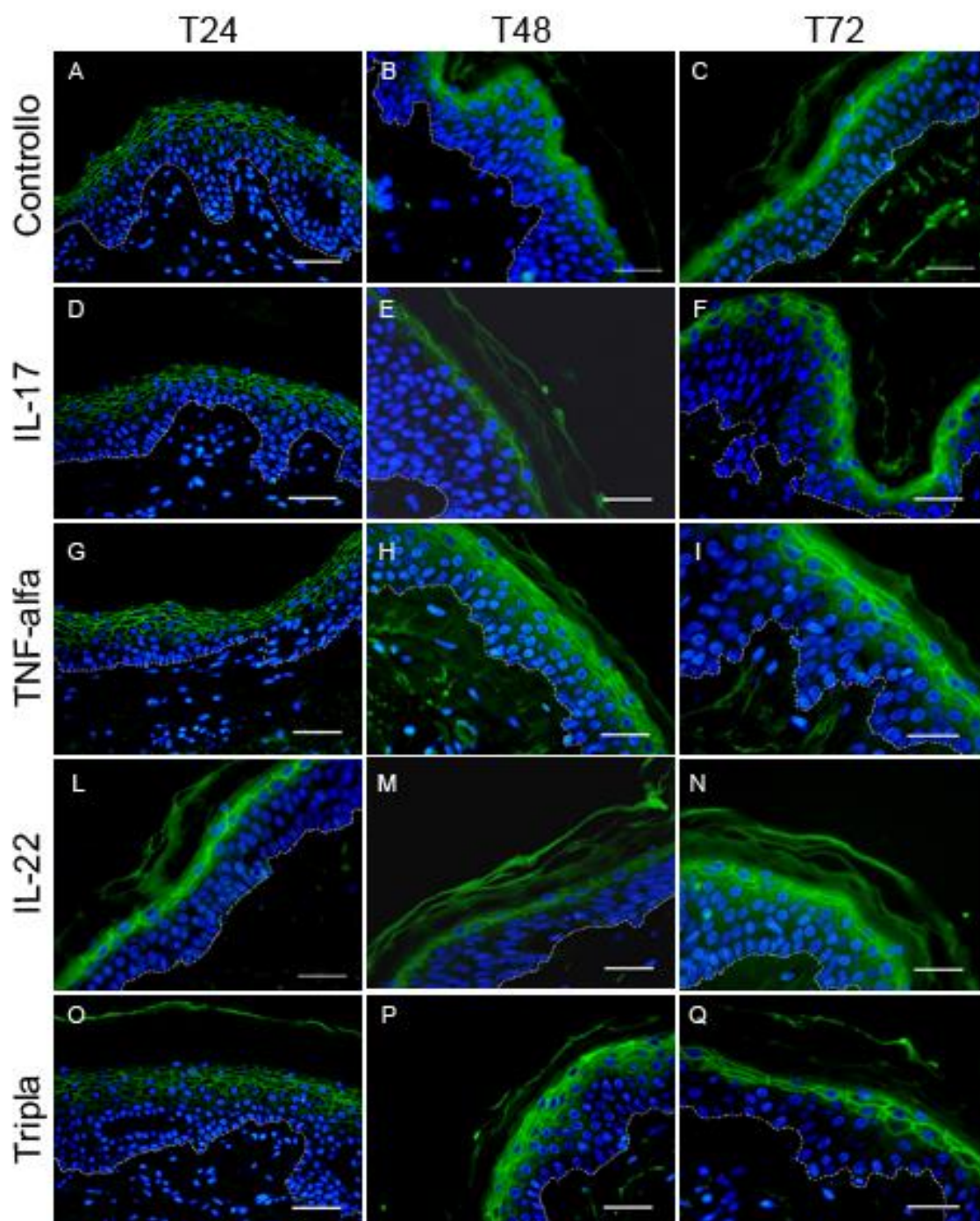
**Figura 26.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della K14. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Gli asterischi bianchi indicano alterazioni della marcatura. K14: citocheratina 14; IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.





**Figura 27.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della K17. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale.

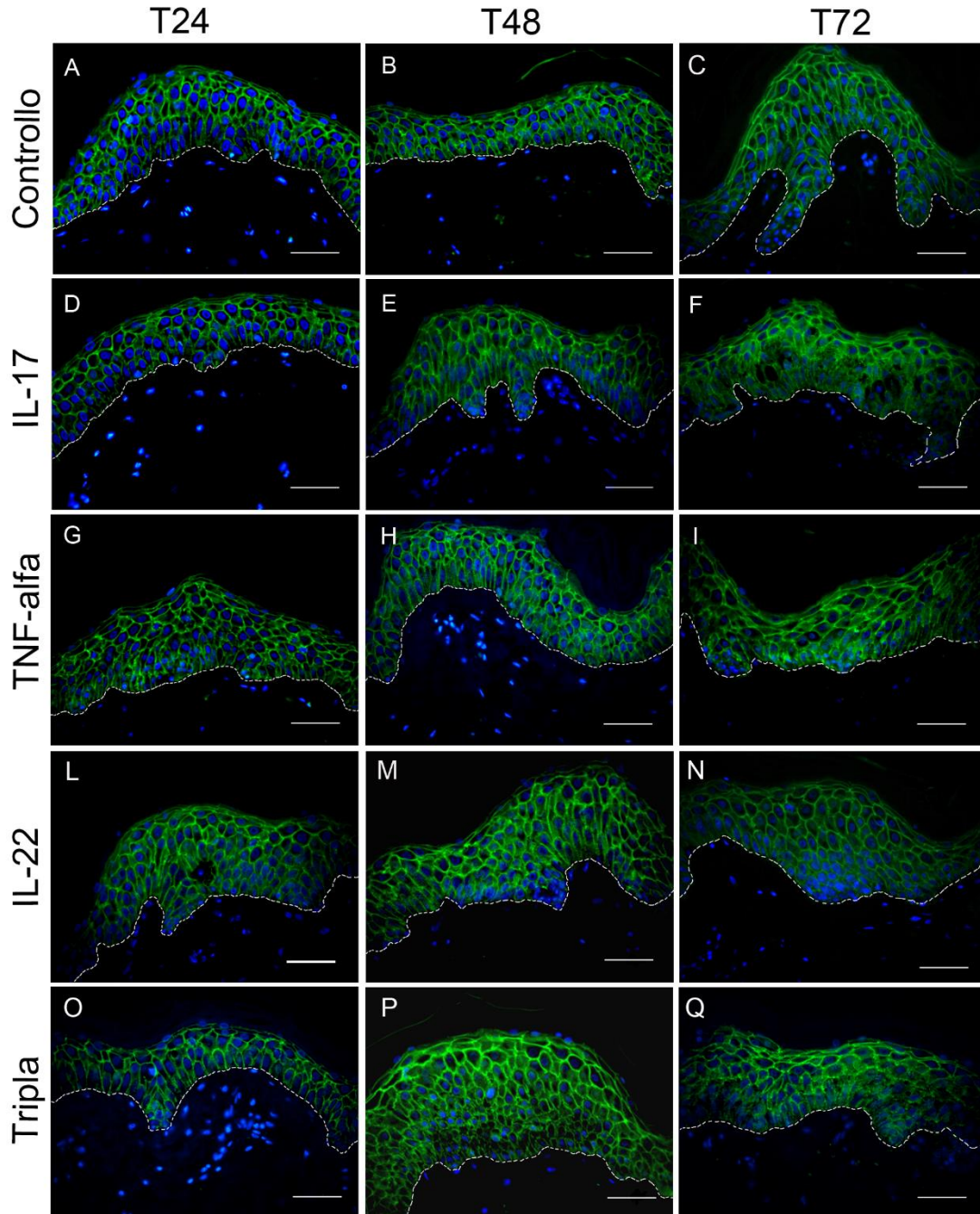
K17: citocheratina 17; IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.



**Figura 28.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della Dsc1. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale.

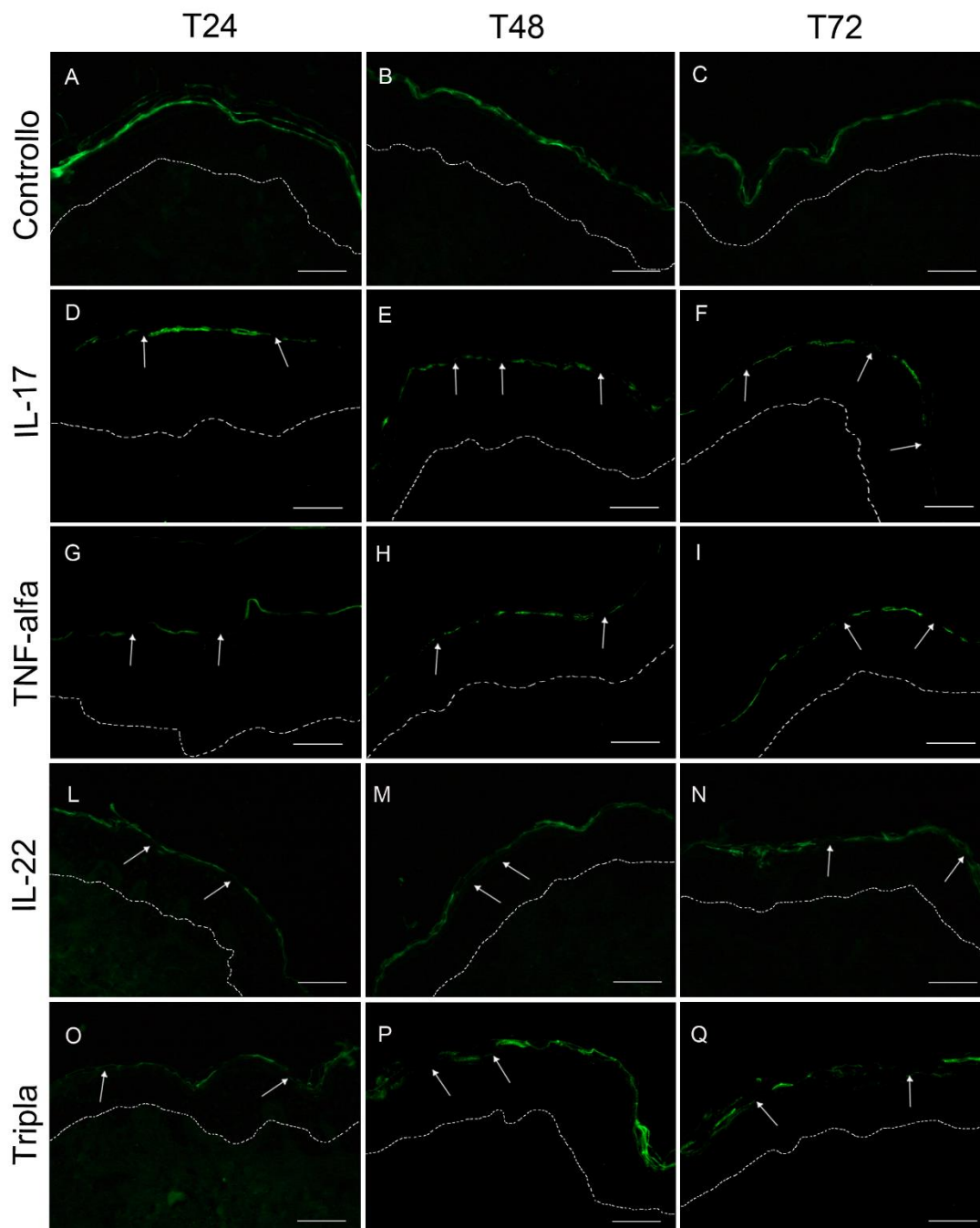
Dsc1: Desmocollina 1; IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.





**Figura 29.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della E-caderina. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale.

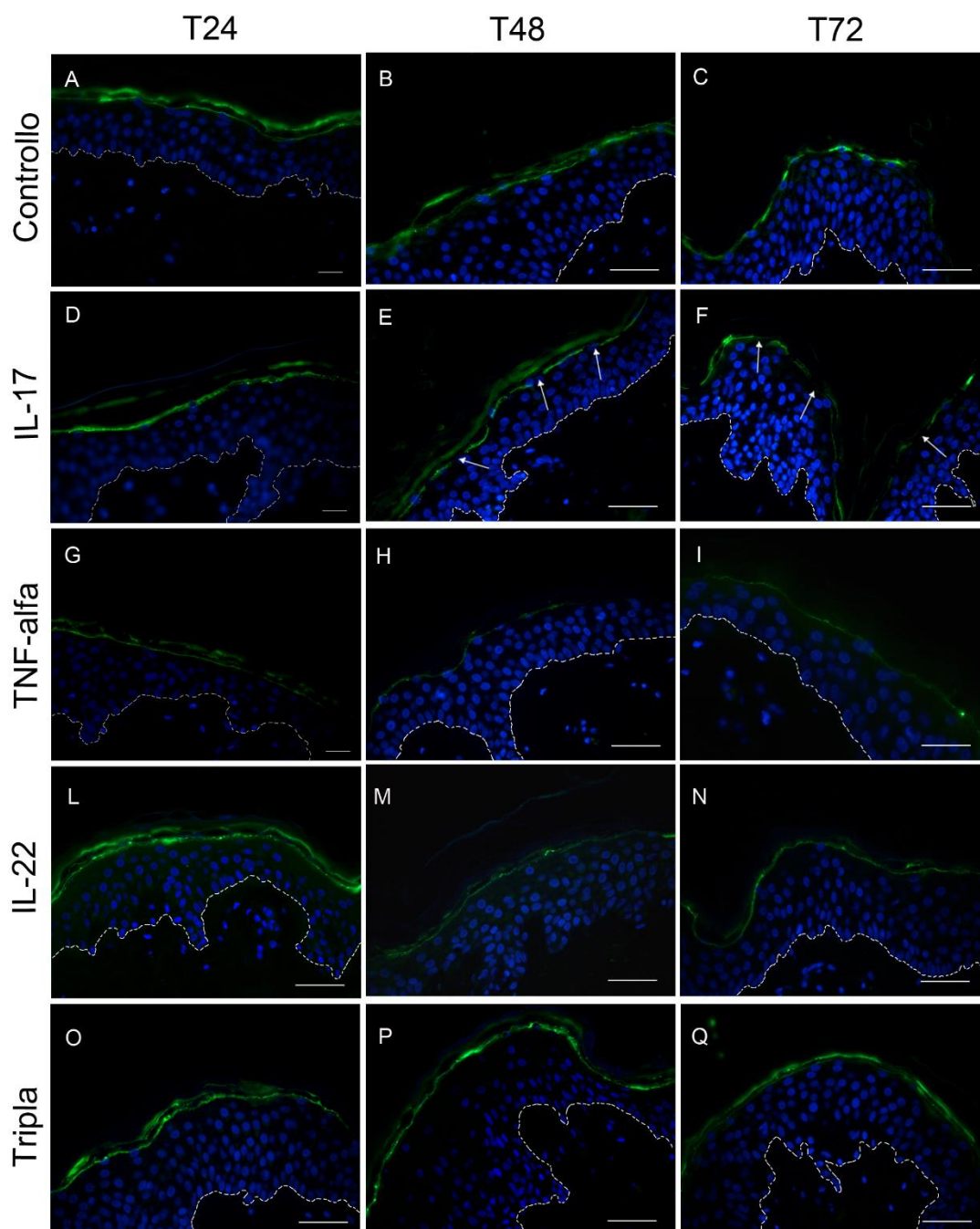
IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.



**Figura 30.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza dell'occludina. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Le frecce bianche indicano la discontinuità della marcatura.

IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22. Barre= 50  $\mu$ m.

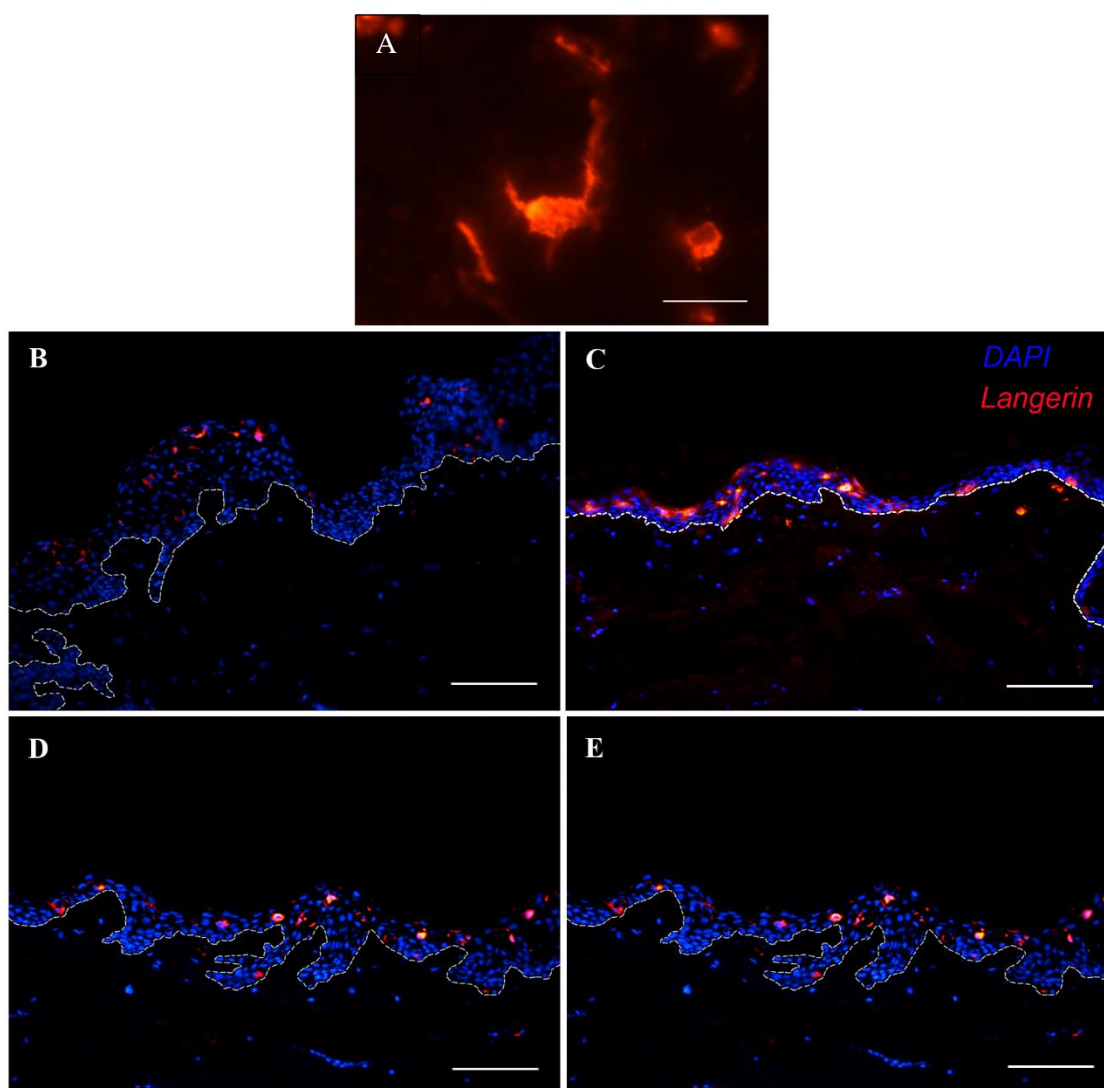




**Figura 31.** Microfotografie di sezioni in paraffina di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della filaggrina. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. I nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale. Le frecce bianche indicano la discontinuità della marcatura. IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= 50  $\mu$ m.

## *Analisi quantitativa delle cellule di Langerhans*

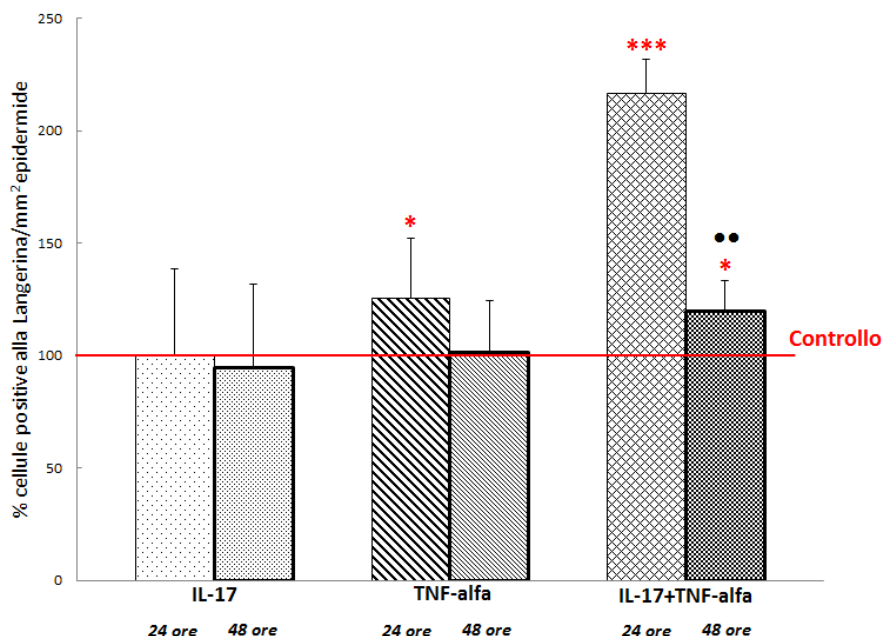
Grazie ad esperimenti di immunofluorescenza abbiamo osservato che le cellule di Langerhans, dal punto di vista morfologico, mostrano un corpo cellulare dal quale si dipartono numerosi processi dendritici (Figura 32 A) e sono localizzate negli strati soprabasali dell'epidermide (Figura 32 B-E).



**Figura 32.** Microfotografie di sezioni congelate di cute umana normale processate per la rivelazione in immunofluorescenza della Langerina. A: microfotografia, a forte ingrandimento, rappresentativa di una cellula di Langerhans positiva all'anticorpo anti-Langerina; B: campioni controllo dopo 24 ore di coltura; C: campioni trattati con IL-17 per 24 ore; D: campioni trattati con TNF-alfa per 24 ore; E: campioni trattati con IL-17 e TNF-alfa per 24 ore. Nelle immagini B-E i nuclei sono controcolorati con DAPI. La linea bianca tratteggiata indica la membrana basale.

IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor alfa; DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindolo diidrocloreuro. Barre= A: 5  $\mu$ m; B-E:100  $\mu$ m.

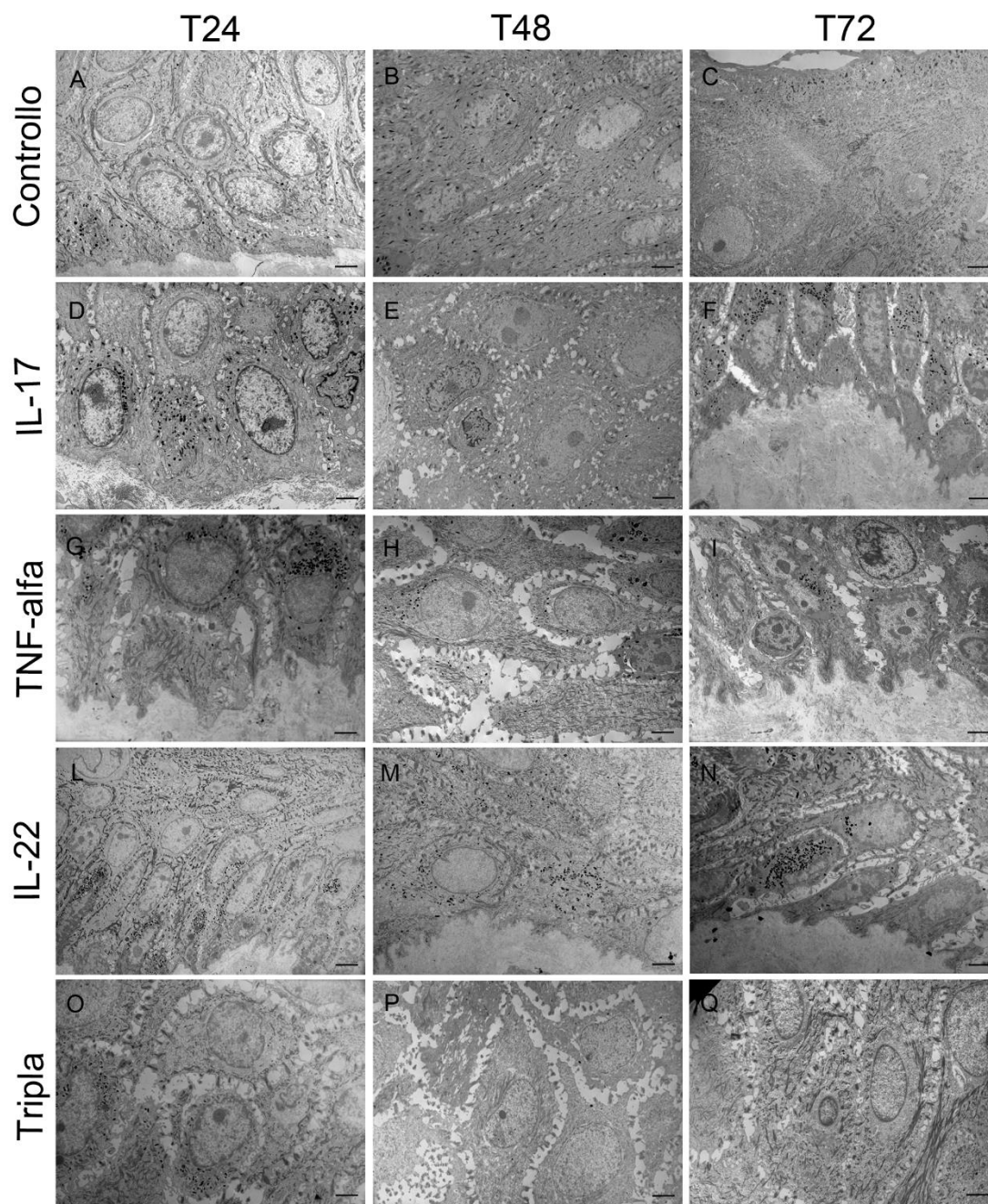
La percentuale del numero delle cellule di Langerhans/mm<sup>2</sup> di epidermide vitale è stata calcolata considerando solo i corpi cellulari positivi per la Langerina dopo 24 e 48 ore di esposizione alle citochine pro-infiammatorie. Attualmente questa valutazione è stata effettuata per i campioni messi in coltura ed esposti a IL-17 e TNF-alfa, singolarmente o in associazione. L'analisi quantitativa è mostrata nella Figura 33 e i campioni controllo (T24 e T48) sono stati considerati come 100% (linea rossa nel grafico). Non sono state osservate differenze tra i campioni T24 e i campioni trattati con IL-17 dopo 24 ore di esposizione. Nei campioni esposti a TNF-alfa abbiamo osservato un incremento lieve, ma statisticamente significativo del numero di cellule di Langerhans ( $p < 0.05$  vs. T24, ANOVA ad una via, Dunnet post test). L'esposizione combinata alle due citochine induce un raddoppio del numero di cellule di Langerhans nel compartimento epidermico se confrontata con il gruppo T24 ( $p < 0.001$  vs. T24, ANOVA ad una via, Dunnet post test). Dopo 48 ore di esposizione a IL-17 e TNF-alfa il numero di cellule epidermiche positive alla Langerina risulta leggermente diminuito (94.99±36.79% e 101.37±23% vs. loro controlli, rispettivamente). Non sono state osservate differenze statisticamente significative rispetto ai controlli. Dopo 48 ore di esposizione alla combinazione di entrambe le citochine, il numero di cellule di Langerhans epidermiche appare fortemente diminuito rispetto ai campioni analizzati dopo 24 ore di incubazione con le citochine, ma è sempre superiore rispetto ai rispettivi controlli (120 + 13.36%).



**Figura 33.** Analisi quantitativa delle cellule di Langerhans epidermiche. I risultati sono espressi come percentuale di cellule di positive alla Langerina/mm<sup>2</sup> di epidermide vitale + 1 deviazione standard, considerando i controlli (T24 e T48) come 100% (linea rossa). \* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$  dopo analisi statistica con ANOVA ad una via; Dunnet come post test rispetto al controllo; •• =  $p < 0.01$  dopo analisi statistica con ANOVA a due vie; Bonferroni post test. IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa.

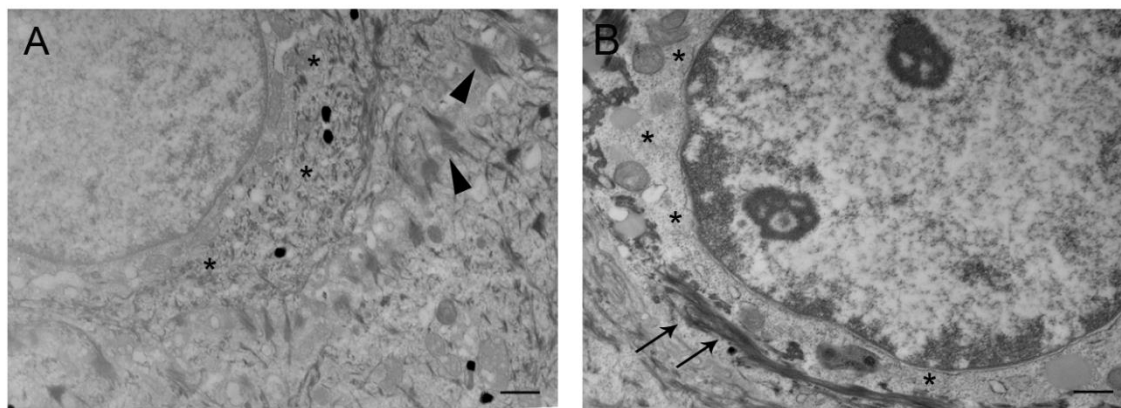
### ***Analisi ultrastrutturale epidermica***

L'analisi al microscopio elettronico a trasmissione ci ha permesso di affermare che in tutti i campioni di cute la struttura tridimensionale è mantenuta. Nei campioni controllo, a tutti i tempi sperimentali considerati, non è stata rilevata nessuna modificazione ultrastrutturale: la membrana basale è risultata continua e ben preservata, non sono state evidenziate cellule apoptotiche, i filamenti di cheratina e le giunzioni intercellulari sono sempre risultate ben conservati (Figura 34 A-C). I campioni esposti a IL-17 (Figura 34 D-F), IL-22 (Figura 34 L-N) o alla combinazione delle tre citochine (Tripla) (Figura 34 O-Q) sono paragonabili ai campioni controllo. Nei campioni trattati con TNF-alfa si è osservato una dilatazione degli spazi intercellulari a partire dalle 24 ore di incubazione (Figura 34 G-I). È interessante notare che, nei campioni esposti a IL-22 i cheratinociti degli strati spinosi superiori hanno mostrato una particolare disposizione del citoscheletro a partire dalle 24 ore dopo l'incubazione con la citochina stessa. In questi campioni, a livello della zona perinucleare è risultata evidente la presenza di cheratina non organizzata in fibrille (Figura 35 A, asterischi). Alla periferia di queste cellule, vicino alla placca desmosomale (Figura 35 A e B, desmosomi indicati da teste di freccia), sono stati invece osservati fasci di cheratina recanti la tipica organizzazione fibrillare (Figura 35 B, frecce).



**Figura 34.** Microfotografie di sezioni fini di cute umana normale processate per la microscopia elettronica a trasmissione. A-C: campioni controllo messi in coltura rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo incubazione overnight; D-F: campioni trattati con IL-17 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; G-I: campioni trattati con TNF-alfa rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; L-N: campioni trattati con IL-22 rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight; O-Q: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa+IL-22 (Tripla) rispettivamente per 24, 48 e 72 ore dopo l'incubazione overnight. IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: tumor necrosis factor-alfa; IL-22: interleuchina 22. Barre= 2  $\mu$ m.





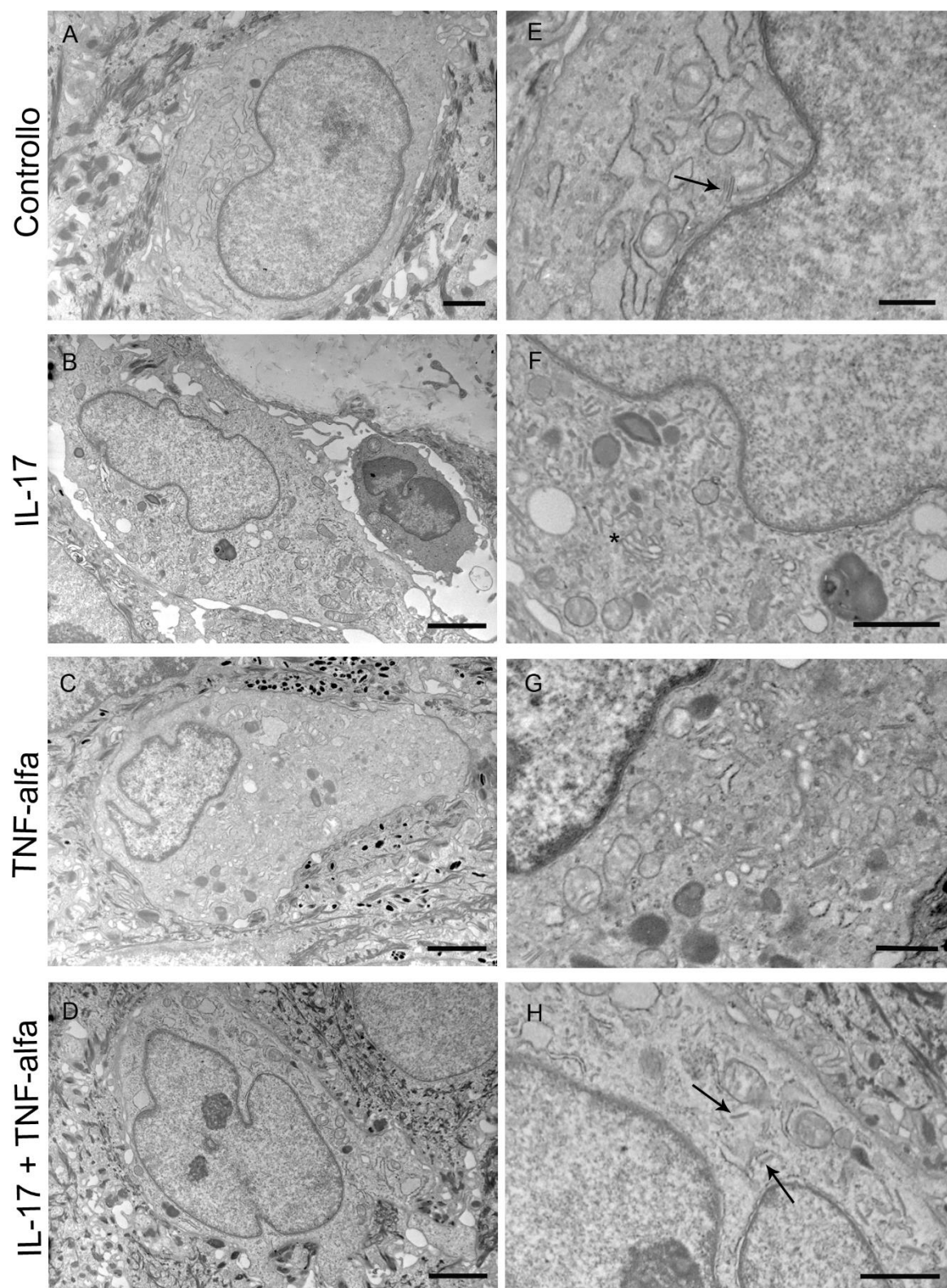
**Figura 35.** Microfotografie di sezioni fini di cute umana normale processate per la microscopia elettronica a trasmissione in seguito ad esposizione a IL-22 per 24 ore, dopo l'incubazione overnight. A, B: cheratinociti dello strato spinoso alto con una deposizione di cheratina non organizzata in fibrille nella zona perinucleare e filamenti di cheratina vicino alla placca desmosomale. Le frecce indicano i filamenti di cheratina; gli asterischi indicano la cheratina non organizzata in fibrille; le teste di freccia indicano i desmosomi.  
IL-22: interleuchina 22. Barre= 500 nm.

### *Analisi ultrastrutturale delle cellule di Langerhans*

Nei campioni di controllo le cellule di Langerhans epidermiche hanno mostrato un ampio nucleo che occupa quasi completamente il citoplasma. All'interno del citoplasma erano presenti pochi organuli, soprattutto mitocondri e poliribosomi (Figura 36 A). A maggiore ingrandimento sono stati osservati alcuni granuli di Birbeck (Figura 36 E, freccia nera).

In tutte le cellule, i granuli di Birbeck erano situati nello spazio tra il nucleo e la zona perigolgiaria, alcuni dei quali organizzati in gruppi. I campioni esposti a IL-17 hanno mostrato un nucleo frastagliato con abbondanti mitocondri (Figura 36 B). All'interno del citoplasma sono state osservate cisterne del reticolo endoplasmatico rugoso. A maggiore ingrandimento molti granuli di Birbeck sono risultati evidenti, presentando caratteristiche morfologiche tipiche delle diverse fasi di maturazione. Diversi granuli sono stati trovati sia vicino allo spazio perinucleare che vicino all'apparato di Golgi o alla periferia (Figura 36 F).

Dopo esposizione a TNF-alfa le cellule di Langerhans epidermiche mostravano un nucleo multidentellato, molti mitocondri e lisosomi (Figura 36 C). A maggiore ingrandimento, i granuli di Birbeck sparsi erano presenti nel citoplasma (Figura 36 G). Quando i campioni sono stati trattati con una combinazione di entrambe le citochine la morfologia delle cellule di Langerhans era paragonabile al gruppo di controllo (Figura 36 D e H, frecce nere). In particolare, il rapporto nucleo/citoplasma era alto e molti mitocondri erano evidenti. D'altra parte, solo rari granuli di Birbeck stati rilevati.



**Figura 36.** Microfotografie di sezioni fini di cute umana normale processate per la microscopia elettronica a trasmissione. A, E: campioni controllo dopo 24 ore di coltura; B, F: campioni trattati con IL-17 per 24 ore dopo l'incubazione overnight; C, G: campioni trattati con TNF-alfa per 24 ore dopo l'incubazione overnight; D, H: campioni trattati con IL-17+TNF-alfa per 24 ore dopo l'incubazione overnight. Le frecce nere indicano i granuli di Birbeck, l'asterisco indica l'apparato di Golgi.

IL-17: interleuchina 17; TNF-alfa: Tumor Necrosis Factor- alfa. Barre= A:1  $\mu$ m; B e D: 2  $\mu$ m; E: 500 nm; F, G: 1  $\mu$ m; H: 500 nm.

## DISCUSSIONE

La psoriasi è stata ampiamente studiata negli ultimi anni, a causa della sua incidenza e diffusione a livello mondiale (Teunissen et al., 1998). Essa può essere considerata come una malattia Th1-mediated con un ruolo centrale svolto da TNF-alfa (Aggarwal et al., 2012), ma, negli ultimi anni, altre citochine sono emerse come principali attori nella patogenesi della patologia stessa (Eyerich et al., 2009; Park et al., 2005). In particolare, IL-17 e IL-22 sono entrambe prodotte da Th17 e la loro presenza è stata mostrata nella cute lesionata di pazienti psoriasici (Grine et al., 2015), portando così a considerare la psoriasi come una malattia Th17-mediated.

Questa patologia è stata classicamente considerata come una malattia epidermica iperproliferativa, in quanto il coinvolgimento dei cheratinociti è sempre stato considerato fondamentale. La continua ricerca in dermatologia ha sottolineato recentemente l'importanza del sistema immunitario nella patogenesi della psoriasi, conferendo un ruolo centrale alle cellule dendritiche nella formazione/progressione della lesione (Kim et al., 2014). In letteratura esistono molti studi relativi all'eziopatogenesi e terapia, ma mancano ancora dati molecolari e cellulari utili a capire i meccanismi iniziali e precoci alla base della psoriasi.

La possibilità di ricreare un microambiente psoriasico in cui diverse citochine interagiscono tra loro rappresenta una condizione sperimentale utile per superare queste limitazioni. I risultati ottenuti nel modello prodotto e standardizzato nel nostro laboratorio mostrano come la struttura tridimensionale dell'epidermide non sia compromessa anche dopo l'esposizione alle citochine. Il dato più interessante, considerando complessivamente i vari marker utilizzati, è che ciascuna citochina pro-infiammatoria ha dimostrato di avere un effetto diverso e specifico sulla proliferazione cellulare, sulla differenziazione terminale, sui desmosomi e sulle giunzioni aderenti e sulle cellule di Langerhans. Al contrario, tutte le citochine pro-infiammatorie da noi considerate sono in grado di indurre una delle principali modifiche specifiche psoriasiche nella barriera epidermica a livello dello strato granuloso (Kirschner et al., 2009) cioè di alterare l'espressione dell'occludina.

Per quanto riguarda la proliferazione cellulare la progressiva riduzione del numero di cellule proliferanti da noi osservata nei campioni controllo è spiegabile in funzione delle condizioni sperimentali da noi adottate che non prevedono l'aggiunta di fattori di crescita, al fine di riprodurre il più fedelmente possibile la situazione fisiologica in vivo. L'esposizione a IL-17 o a TNF-alfa ha indotto l'immediata diminuzione della proliferazione epidermica. La risposta anti-proliferativa precoce e significativa indotta da TNF-alfa e IL-17, a partire dalle 24 ore di coltura, sui cheratinociti epidermici umani, come da noi recentemente dimostrato



(Donetti et al., 2014), può essere considerata, almeno in parte, una "response-to-injury". A tempi più lunghi, l'iperplasia epidermica caratteristica delle placche psoriasiche può essere considerata come un risultato di una iper-proliferazione in parte conseguente alla precoce inibizione della proliferazione cellulare indotta da TNF-alfa e IL-17. L'esposizione a IL-22, diversamente da TNF-alfa e IL-17, non determina un'inibizione immediata della proliferazione cellulare, ma ciò avviene solo a tempi più lunghi, cioè dopo 72 ore di incubazione. Questa osservazione è in accordo con la capacità, riportata in letteratura, di IL-22 di avere effetti specifici e intrinseci sulla proliferazione cellulare (Zhang et al., 2012).

L'elevata resistenza delle strutture giunzionali ed il loro ruolo cardine nell'adattamento a stimoli di varia natura (Green et al., 2000) è confermato dall'assenza di alterazioni nella distribuzione sia della caderina desmosomiale Dsc1 sia della E-caderina nei campioni esposti alle diverse citochine pro-infiammatorie a tutti i tempi sperimentali, rispetto ai controlli. Considerando che la K17 è espressa nelle lesioni psoriasiche, ma non nella cute normale e che l'espressione della K17 correla con la gravità della psoriasi (Lan et al., 2014) e ne rappresenta un segno distintivo della malattia, possiamo suggerire che l'alterazione delle ultime fasi della differenziazione terminale dei cheratinociti, dopo l'esposizione a IL-22 e IL-17, è responsabile dell'acantosi osservata nelle lesioni psoriasiche insieme all'iperproliferazione.

Alterazioni nel processo di differenziazione dei cheratinociti epidermici sono confermate anche dai gruppi di cellule K10-negative negli strati soprabasali osservati nei campioni trattati con IL-22. In questo caso, la differenziazione è alterata nelle fasi iniziali, cioè quando i cheratinociti lasciano lo strato basale e perdono la loro capacità proliferativa. La particolare organizzazione dei fasci di cheratina evidenziata a livello ultrastrutturale nei campioni esposti a IL-22 può essere legata al fatto che la deposizione della K17 neo sintetizzata avviene nei pressi del nucleo e coesiste con le tonofibrille di K10 precedentemente organizzate. Abbiamo precedentemente riportato che né IL-17 né TNF-alfa sono stati in grado di indurre una variazione nell'espressione della K10 nel nostro modello sperimentale (Donetti et al., 2014). In particolare, sembrano esistere differenze tra IL-22 e IL-17, entrambe prodotte da Th17, nell'attivare vie specifiche di trasduzione del segnale, con una maggiore specificità di IL-22 per la differenziazione terminale e di IL-17 per la proliferazione cellulare. Fino ad ora solo uno studio di Nograles e coll. (Nograles et al., 2008) ha valutato i diversi pathways attivati da IL-22 e IL-17 nei cheratinociti in vitro (Sa et al., 2007) e nell'epidermide ricostituita (Chiricozzi et al., 2014), mostrando che IL-22 down-regola specificamente diversi geni coinvolti nel differenziamento dei cheratinociti epidermici.

Parallelamente, dati di letteratura hanno sottolineato l'importanza delle cellule dendritiche nella formazione/progressione della lesione psoriasica, ma è ancora molto ridotta la conoscenza sulla risposta precoce delle cellule di Langerhans in seguito ad uno specifico stimolo infiammatorio. Per questo motivo abbiamo valutato nel nostro modello tridimensionale la distribuzione epidermica delle cellule di Langerhans e la loro ultrastruttura osservando un ruolo specifico di ciascuna citochina in relazione al loro grado di attivazione. I risultati da noi osservati indicano un'attività chemoattrattiva esercitata da TNF-alfa, senza l'induzione di un'evidente attivazione morfologica, in accordo con dati precedentemente riportati in letteratura (Kimber and Cumberbatch, 1992). È interessante notare che, quando IL-17 e TNF-alfa sono aggiunte contemporaneamente al mezzo di coltura, si verifica un aumento notevole e statisticamente significativo del numero di cellule di Langerhans epidermiche, con un possibile effetto sinergico tra IL-17 e TNF-alfa, in cui quest'ultimo sembra potenziare l'attività di entrambe le citochine.

Le caratteristiche morfologiche delle cellule di Langerhans epidermiche non attivate sono tipiche di campioni con un elevato numero di cellule di Langerhans osservate dopo l'analisi quantitativa, suggerendo che l'attivazione è necessaria per lasciare il compartimento epidermico. Possiamo quindi ipotizzare che, nel nostro modello sperimentale, IL-17 è in grado di indurre la maturazione delle cellule di Langerhans, ma non ancora una down-regolazione dell'espressione E-caderina in tali cellule, spiegando così il motivo per cui il numero di cellule positive alla Langerina/mm<sup>2</sup> nei campioni trattati con IL-17 è paragonabile con i campioni controllo a 24 ore.

I nostri risultati per quanto riguarda la potenziale attività chemoattrattiva esercitata da TNF-alfa sono concordi alle diverse osservazioni cliniche. Un aumento di cellule di Langerhans nelle placche psoriasiche è stato evidenziato da Prignano e coll (Prignano et al., 2009). Così come, una riduzione delle cellule dendritiche è stata osservata dopo trattamento con farmaci biologici anti-TNF-alfa (Prignano et al., 2009; Marble et al., 2007). In letteratura sono riportati risultati contrastanti sulla presenza di cellule di Langerhans nella psoriasi (Alshenawy and Hasby, 2011; Fujita et al., 2011), principalmente a causa della mancanza di modelli sperimentali attendibili. Precedenti lavori su cellule di Langerhans sono stati effettuati sia in organo colture di cute Trowell-type dopo l'esposizione a GM-CSF o TNF-alfa (Rambukkana et al., 1995), o considerando i risultati di contatto con allergeni/sensibilizzanti in espianti di cute umana (Pistor et al., 1996; Rustemeyer et al., 2003).

Tutti questi risultati sostengono fortemente l'ipotesi che un esiste effetto sinergico tra le citochine pro-infiammatorie psoriasiche e che la loro interazione nel microambiente della

placca psoriasica determina una conseguente amplificazione dell'effetto di ciascuna citochina.

Pertanto, l'inibizione di più citochine può essere una valida strategia per la terapia della psoriasi, come suggerito da una marcata riduzione dei sintomi in un modello sperimentale di artrite psoriasica con contemporanea inibizione di TNF-alfa e IL-17 (Koenders et al., 2011). Questi ultimi risultati sono rilevanti per il trattamento della psoriasi dove i meccanismi infiammatori devono essere presi in considerazione insieme ai pathways immunologici. Un altro aspetto importante è che la contemporanea inibizione dell'effetto di diverse citochine - tutte con un ruolo definito nella patogenesi della psoriasi e nel decorso della malattia - potrebbe migliorare ulteriormente il trattamento della psoriasi. La sinergia potrebbe essere efficace dove un singolo trattamento biologico non è in grado di ottenere risultati clinici persistenti. È ben noto ai dermatologi esperti che utilizzano farmaci biologici diretti contro una citochina o fattore di crescita nella psoriasi, come è deludente mantenere nel tempo i risultati clinici ottenuti.

In conclusione, possiamo dire che questo modello sperimentale rappresenta un modo semplice, ma efficace, per studiare le interazioni precoci tra le cellule epidermiche e i fattori solubili coinvolti nella formazione di lesione psoriasica. La sua utilità principale consiste nella possibilità di valutare l'attività precoce, intrinseca e specifica di ciascuna citochina pro-infiammatoria psoriasica direttamente sul compartimento epidermico, da sola o in associazione.

## BIBLIOGRAFIA

- Adami S, Cavani A, Rossi F, Girolomoni G. The role of interleukin-17A in psoriatic disease. *Bio Drugs* 2014; 28:487-497.
- Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 2012; 119:651-665.
- Alshenawy HA, Hasby EA. Immunophenotyping of dendritic cells in lesional, perilesional and distant skin of chronic plaque psoriasis. *Cell. Immunol.* 2011; 269:115-119.
- Anastasi G, Capitani S, Carnazza ML, Cinti S, De Caro R, Donato RF, Ferrario VF, Fonzi L, Franzi AT, Gaudio E et al. *Trattato di anatomia umana*. Edi-Ermes Editore 2012.
- Banno T, Gazel A, Blumenberg M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:32633-32642.
- Bedoni M, Sforza C, Dolci C, Donetti E. Proliferation and differentiation biomarkers in normal human breast skin organotypic cultures. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 46:139-142.
- Blumenberg M. Molecular biology of human keratin genes. In: *Molecular biology of the skin. The keratinocyte*. Darmon M, Blumenberger M, Editors. Academic Press. 1993; 1-32.
- Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurnay AL; Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.* 2005; 174:3695-3702.
- Bowcock AM, Barker JN. Genetics of psoriasis: the potential impact on new therapies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2003; 49:S51-56.
- Bragulla HH, Homberger DG. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J. Anatomy* 2009; 214:516-559.
- Brandner JM. Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur. J. Pharma. Biopharma.* 2009; 72:289-294.
- Cheifetz A, Mayer L. Monoclonal antibodies, immunogenicity, and associated infusion reactions. *Mt. Sinai J. Med.* 2005; 72:250-256.
- Chiricozzi A, Nogales KE, Johnson-Huang LM, Fuentes-Duculan J, Cardinale I Bonifacio KM, Gulati N, Mitsui H, Guttman-Yassky E, Suarez-Farinas M, Krueger JG. IL-17 induces an expanded range of downstream genes in reconstituted human epidermis model. *PLoS One* 2014; 9:e90284.
- Dale BA, Presland RB, Fleckman P, Kam E, Resing KA. Phenotypic expression and processing of filaggrin in epidermal differentiation. In: *Molecular biology of the skin*.

- The keratinocyte. Darmon M, Blumenberger M, Editors. Academic Press. 1993; 79-106.
- Dale BA, Resing KA, Presland RB. Keratohyalin granule proteins. In: The keratinocyte handbook. Leigh I, Lane B, Watt F, Editors. Cambridge University Press. 1994; 323-350.
- Davidson A, Diamond B. Advances in immunology - Autoimmune diseases. N. Eng. J. Med. 2001; 345:340-350.
- Davison SC, Ballsdon A, Allen MH, Barker JN. Early migration of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) positive T cells into evolving psoriatic plaques. Exp. Dermatol. 2001; 10:280-285.
- Desai SB, Furst DE. Problems encountered during anti-tumor necrosis factor therapy. Best Pract. Res. 2006; 20:757-790.
- Donetti E, Bedoni M, Boschini E, Bertelli AA, Sforza C, Gagliano N. Early epidermal response after a single dose of gamma-rays in organotypic culture of human breast skin. Br. J. Dermatol. 2005; 153:881-886.
- Donetti E, Bedoni M, Boschini E, Dellavia C, Barajon I, Gagliano N. Desmocollin 1 and desmoglein 1 expression in human epidermis and keratinizing oral mucosa: a comparative immunohistochemical and molecular study. Arch. Dermatol. Res. 2005; 297:31-38.
- Donetti E, Bedoni M, Capone P, Gualerzi A, Tartaglia G, Sforza C. An in vitro model of human oral explants to study early effects of radiation mucositis. Eur. J. Oral Sci. 2009; 117:169-174.
- Donetti E, Cornaghi L, Gualerzi A, Baruffaldi Preis FW, Prignano F. An innovative three-dimensional model of normal human skin to study the pro-inflammatory psoriatic effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-17. Cytokine 2014; 68:1-8.
- Donetti E, Gualerzi A, Ricceri F, Pescitelli L, Bedoni M, Prignano F. Etanercept restores a differentiated keratinocyte phenotype in psoriatic human skin: a morphological study. Exp. Dermat. 2012; 21:549-555.
- Ducharme E, Weinberg JM. Etanercept. Expert Opinion on Biological Therap. 2008; 8:491-502.
- Esposito V. Anatomia Microscopica con note funzionali e cliniche. EdiSES Editore 2014.
- Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. J. Clin. Invest. 2009; 119:3573-3585.

- Fabbri P. La psoriasi. In: Fabbri P ed. Immunità e cute. Le dermatosi a patogenesi immunologica. Lingomed 2012.
- Farber EM, Nall ML. The natural history of psoriasis in 5,600 patients. *Dermatol.* 1974; 148:1-18.
- Fogh K, Iversen L, Herlin T, Kragballe K. Modulation of eicosanoid formation by lesional skin of psoriasis: an ex vivo skin model. *Acta. Derm. Venereol.* 1993; 73:191-193.
- Fransson J, Hammar H. Epidermal growth in the skin equivalent. *Arch. Dermatol. Res.* 1992; 284:343-348.
- Fu M, Wang G. Keratin 17 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 2012; 67:161-165.
- Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Ann. Rev. Biochem.* 1994; 63:345-382.
- Fujita H, Shemer A, Suárez-Farinas M, Johnson-Huang LM, Tintle S, Cardinale I, Fuentes-Duculan J, Novitskaya I, Carucci JA, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Lesional dendritic cells in patients with chronic atopic dermatitis and psoriasis exhibit parallel ability to activate T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011; 128:574-582.
- Fujiwara S, Nagai H, Oniki S, Yoshimoto T, Nishigori C. Interleukin (IL)-17 versus IL-27: opposite effects on tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated chemokine production in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 2012; 21:70-72.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:556-567.
- Gan SQ, McBride OW, Idler WW, Markova N, Steinert PM. Organization, structure, and polymorphisms of the human profilaggrin gene. *Biochemistry* 1990; 29:9432-9440.
- Garrod DR, Merritt AJ, Nie Z. Desmosomal cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002; 14:537-545.
- Girolomoni G, Mrowietz U, Paul C. Psoriasis: rationale for targeting interleukin-17. *Br. J. Dermatol.* 2012; 167:717-724.
- Gottlieb AB. Psoriasis: emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2005; 4: 19-34.
- Gratzner HG. Monoclonal antibody 5-bromo-iododeoxy-uridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218:474-475.
- Green KJ, Gaudry CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1:208-216.

- Green KJ, Simpson CL. Desmosomes: New perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* 2007; 127:2499-2515.
- Grine L, Dejager L, Libert C, Vandenbroucke RE. An inflammatory triangle in psoriasis: TNF, type I IFNs and IL-17. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015; 26:25-33.
- Gröne A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 88:1-12.
- Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M, Selvakumar TA, McPherson T, Taylor S, Ogg GS. IL-17 influences expression of genes associated with barrier function in keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 2012; 164:104-110.
- Henkler F, Strom M, Mathers K, Cordingley H, Sullivan K, King I. Transgenic misexpression of the differentiation-specific desmocollin isoform 1 in basal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 116:144-149.
- Holthofer B, Windoffer R, Troyanovsky S, Leube RE. Structure and function of desmosomes. *Int. Rev. Cytol.* 2007; 264:65-163.
- Ishii K. Greater diversity of desmosomal cadherins. *J. Invest. Dermatol.* 2003; 120:IX-X.
- Johnson-Huang LM, Scott McNutt N, Krueger JG, Lowes MA. Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J. Clin. Immunol.* 2009; 29:247-256.
- Karantza V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011; 30:127-138.
- Kimber I, Cumberbatch M. Stimulation of Langerhans cell migration by tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha). *J. Invest. Dermatol.* 1992; 99:48S-50S.
- Kirschner N, Poetzl C, von den Driesch P, Wladykowski E, Moll I, Behne MJ, Brandner JM. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am. J. Pathol.* 2009; 175:1095-1106.
- Kitajima Y. Mechanisms of desmosome assembly and disassembly. *Clinical and Exp. Dermatol.* 2002; 27:684-690.
- Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LA, Roth J, van Lent PL, van de Loo FA, van den Berg WB. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 $\beta$ , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011; 63:2329-2339.
- Kristensen M, Chu CQ, Eedy DJ, Feldmann M, Brennan FM, Breathnach SM. Localization of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and its receptors in normal and psoriatic

- skin: epidermal cells express the 55-kD but not the 75-kD TNF receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 1993; 94:354-362.
- Lan YJ, Chen H, Chen JQ, Lei QH, Zheng M, Shao ZR. Immunolocalization of Vimentin, Keratin 17, Ki-67, Involucrin,  $\beta$ -Catenin and E-Cadherin in cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.* 2014; 20:263-266.
- Langbein L, Grund C, Kuhn C, Praetzel S, Kartenbeck J, Brandner JM, Moll I, Franke WW. Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.* 2002; 81:419-435.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 2005; 201:233-240.
- Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, Muller M, di Padova F, Moore M, Ryffel B, Eugster HP. Tumor necrosis factor receptor-1 signaling is required for differentiation of follicular dendritic cells, germinal center formation, and full antibody responses. *J. Inflamm.* 1995; 47:76-80.
- Leonardo E. *Morfologia molecolare: Principi generali e diagnostica sistematica.* Libreriauniversitaria.it 2011; 166-171.
- Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445:866-873.
- Lu H, Kuang YH, Su J, Chang J, Wu LS, Kanekura T, Li D, Chen ML, Chen X. CD147 is highly expressed on peripheral blood neutrophils from patients with psoriasis and induces neutrophil chemotaxis. *J. Dermatol.* 2010; 37:1053-1056.
- Mabuchi T, Chang TW, Quinter S, Hwang ST. Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *J. Dermatol. Sci.* 2012; 65:4-11.
- Mahoney MG, Hu Y, Brennan D, Bazzi H, Christiano AM, Wahl JK. Delineation of diversified desmoglein distribution in stratified squamous epithelia: implications in diseases. *Exp. Dermatol.* 2006; 15:101-109.
- Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ. Targeting TNF $\alpha$  rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. *J. Dermatol. Sci.* 2007; 48:87-101.
- Margulis A, Zhang W, Garlick JA. In vitro fabrication of engineered human skin. *Methods Mol. Biol.* 2005; 289:61-70.



- Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees AS, Leonardi CL, Gordon KB, Lebwohl M, Koo JY, Elmets CA, Korman NJ, Beutner KR, Bhushan R. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriasis arthritis Section 1. Overview of psoriasis and Guidelines of care for the treatment with biologics. *J. Am Acad. Dermatol.* 2008; 58:826-850.
- Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2008; 8:935-947.
- Miossec P, Kolls JK. Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation. *Nature* 2012; 11:763-776.
- Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J. Dental Res.* 2007; 86:115-124.
- Nestle FO, Nickoloff BJ. From classical mouse models of psoriasis to a spontaneous xenograft model featuring use of AGR mice. *Ernst Schering Res. Found workshop* 2005; 50:203-212.
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361:496-509.
- Netzlaff F, Lehr CM, Wertz PW, Schaefer UF. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60:167-178.
- Nogales KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, Khatcherian A, Gonzales J, Pierson KC, White TR, Pensabene C, Coats I, Novitskava I, Lowes MA, Kruger JG. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br. J. Dermatol.* 2008; 159:1092-1102.
- North AJ, Chidgey MA, Clarke JP, Bardsley WG, Garrod DR. Distinct desmocollin isoforms occur in the same desmosomes and show reciprocally graded distributions in bovine nasal epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93:7701-7705.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 2005; 6:1133-1141.
- Patel RV, Clark LN, Lebwohl M, Weinberg JM. Treatments for psoriasis and the risk of malignancy. *J Am. Acad. Dermatol.* 2009; 60:1001-1017.
- Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. *Immunologia, infezione, immunità.* Piccin Editore 2006.

- Pistoor FH, Rambukkana A, Kroezen M, Lepoittevin JP, Bos JD, Kapsenberg ML, Das PK. Novel predictive assay for contact allergens using human skin explant cultures. *Am. J. Pathol.* 1996; 149:337-343.
- Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: Function in health and disease. *Critical Rev. Oral Biol. Med.* 2000; 11:383-408.
- Prignano F, Gerlini G, Fossombroni V, Pimpinelli N, Giannotti B, Nestle FO, Romagnoli P. Control of the differentiation state and function of human epidermal Langerhans cells by cytokines in vitro. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2001; 15:433-440.
- Prignano F, Ricceri F, Bianchi B, Lotti T. Quantity, distribution and immunophenotypical modification of dendritic cells upon biological treatments in psoriasis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2009; 22:379-387.
- Rambukkana A, Bos JD, Irik D, Menko WJ, Kapsenberg ML, Das PK. In situ behaviour of human Langerhans cells in skin organ culture. *Lab. Invest.* 1995; 73:521-531.
- Raychaudhuri SP, Farber EM. The prevalence of psoriasis in the world. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2001; 15:16-17.
- Raychaudhuri SP, Sanyal M, Raychaudhuri SK, Dutt S, Farber EM. Severe combined immunodeficiency mouse-human skin chimeras: a unique animal model for the study of psoriasis and cutaneous inflammation. *Br. J. Dermatol.* 2001; 144:931-939.
- Rosdy M, Clauss LC. Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at air-liquid interface. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 95:109-114.
- Rustemeyer T, Preuss M, von Blomberg BM, Das PK, Scheper RJ. Comparison of two in vitro dendritic cell maturation models for screening contact sensitizers using a panel of methacrylates. *Exp. Dermatol.* 2003; 12:682-691.
- Sa SM, Valdez PA, Wu J, Jung K, Zhong F, Hall L, Kasman I, Winer J, Modrusan Z, Danilenko DM, Ouvang W. The effects of IL-20 subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis. *J. Immunol.* 2007; 178:2229-2240.
- Scarpa R, Altomare G, Marchesoni A, Balato N, Cerinic MM, Lotti T, Olivieri I, Vena GA, Salvarani C, Valesini G, Giannetti A. Psoriatic disease: concepts and implications. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 2010; 24:627-630.
- Schmitt-Egenolf M, Eiermann TH, Boehncke WH et al. Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended

- haplotype Cw6-B57\_DRB1\*0701-DQA1\*0201- DQB1\*0303: a population and family-based study. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106:711-714.
- Shi X, Jin L, Dang E, Chang T, Feng Z, Liu Y, Wang G. IL-17A upregulates keratin 17 expression in keratinocytes through STAT1- and STAT3-dependent mechanisms. *J. Invest. Dermatol.* 2011; 131:2401-2408.
- Simon M, Haftek M, Sebbag M, Montezin M, Girbal-Neuhsuser E, Schmitt D, et al. Evidence that filaggrin is a component of cornified cell envelopes in human plantar epidermis. *Biochem. J.* 1996; 317:173-177.
- Soboleva AG, Mezentsev A, Zolotorenko A, Bruskin S, Pirusian E. Three-dimensional skin models of psoriasis. *Cells Tissues Organs* 2014; 199:301-310.
- Stambach NS, Taylor ME. Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology* 2003; 13:401-410.
- Steinert PM, Marekov LN. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodi-peptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 17702-17711.
- Steinert PM, Roop DR. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.* 1988; 57:593-625.
- Sterry W, Barker J, Boehncke WH, Bos JD, et al. Biological therapies in the systemic management of psoriasis: international consensus conference. *Br. J. Dermatol.* 2004; 151:3-17.
- Sweeney CM, Tobin AM, Kirby B. Innate immunity in the pathogenesis of psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 2011; 303:691-705.
- Teunissen MB, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 159:1092-1102.
- Thomas JA, Biggerstaff M, Sloane JP, Easton DF. Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. 1984; 16:507-519.
- Trojanovsky SM, Guelstein VI, Tchipysheva TA, Krutovskikh VA, Bannikov GA. Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position. *J. Cell Sci.* 1989; 93:419-426.
- Valladeau J, Clair-Moninot V, Dezutter-Dambuyant C, Pin JJ, Kissenpfenning A, Mattéi MG, Ait-Yahia S, Bates EE, Malissen B, Koch F, Fossiez F, Romani N, Lebecque S,

- Saeland S. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J. Immunol.* 2002; 168:782-792.
- Vangipuram R, Feldman SR. Ultraviolet phototherapy for cutaneous diseases: a concise review. *Oral Dis.* 2015; (Epub ahead of print).
- Wallace L, Roberts-Thompson L, Reichelt J. Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity. *J. Cell Sci.* 2012; 125:1750-1758.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:1309-1323.
- Xia YP, Li BS, Hylton D, Detmar M, Yancopoulos GD, Rudge JS. Transgenic delivery of VEGF to mouse skin leads to an inflammatory condition resembling human psoriasis. *Blood* 2003; 102:161-168.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J. Immunol.* 1995; 155:5483-5486.
- Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Johnson-Huang, LM, Nogales KE, White TR, Pierson KC, Lentini T, Suarez-Farinas M, Lowes MA, Krueger JG. Identification of TNF-related apoptosis-inducing ligand and other molecules that distinguish inflammatory from resident dendritic cells in patients with psoriasis. *J. All. Clin. Immunol.* 2010; 125:1261-1268.
- Zhang W, Dang E, Shi X, Jin L, Feng Z, Hu L, Wu Y, Wang G. The pro-inflammatory cytokine IL-22 up-regulates keratin 17 expression in keratinocytes via STAT3 and ERK1/2. *PLoS One* 2012; 7:e40797.

I dati presentati in questa Tesi di Dottorato sono stati oggetto di pubblicazione in riviste internazionali:

Donetti E, **Cornaghi L**, Gualerzi A, Baruffaldi Preis FW, Prignano F. An innovative three-dimensional model of normal human skin to study the proinflammatory psoriatic effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 17. *Cytokine* 68 (2014) 1-8.

Prignano F, Arnaboldi F, **Cornaghi L**, Landoni F, Tripo L, Baruffaldi Preis FW, Donetti E. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-17 differently affects Langerhans cell distribution and activation in an innovative three-dimensional model of normal human skin. *European Journal of Cell Biology* 94 (2015) 71-77.

## RINGRAZIAMENTI

Tre anni!! Un'esperienza intensa, entusiasmante, davvero a 360°, sia professionale che formativa e, soprattutto, dal punto di vista personale. Mi ha dato molto sotto diversi aspetti, è stata una bella avventura che ho affrontato fino ad ora e che, a me come altri, ha dato la possibilità di vivere davvero un percorso di alto livello, ricco di numerose esperienze. Tutto ciò ha contribuito moltissimo alla mia crescita personale.

Dedico tutto il lavoro svolto alle persone che hanno creduto in me e che mi hanno sempre sostenuto nei momenti difficili e nei momenti felici.

Tuttavia il mio più importante pensiero e ringraziamento sono per la Prof.ssa Elena Donetti che è stata al mio fianco in questi tre anni di Dottorato, mostrandomi fin da subito fiducia e trasmettendomi ogni giorno l'amore e la passione per la ricerca.

Ringrazio la Prof.ssa Chiarella Sforza, coordinatore della Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche, Fisiologiche e dello Sport.

Un grazie di cuore a Francesca: in te ho trovato non solo un'ottima maestra, ma una grande amica; non posso dimenticare Federica (la mia Darling!!!): insieme ne abbiamo passate tante sia in laboratorio sia nella vita.

Ringrazio la Prof.ssa Silvia De Biasi: grazie a te ho scoperto la mia passione per la ricerca. Sono la persona di oggi perché tu molti anni fa sei stata in grado di guidarmi e di credere in me.

Vorrei ringraziare infinitamente la mia famiglia perché mi è sempre stata accanto e non mi ha fatto mai mancare il suo sostegno e il suo aiuto. Senza di loro non sarei mai diventata ciò che sono e non avrei mai potuto coronare i miei sogni. Un grazie speciale lo voglio fare a te, mamma Bruna, perché mi hai sempre coccolato e continui a farlo, non mi hai fatto mancare il tuo sostegno. Grazie papà Silvano, perché mi sei sempre stato accanto nei momenti difficili, cercando sempre di darmi consigli nelle mie scelte. Grazie ad entrambi perché, pur non essendo perfetti, siete stati i genitori migliori del mondo.

Grazie anche ad Angelino (anzi Michele): il mio fratellino, o meglio il mio alter ego, la persona senza la quale non sarei come sono. Sei la persona più importante della mia vita e sempre lo sarai. Anche se saremo lontani ti porterò con me e ti proteggerò.

Grazie a Giorgio. Sei sempre stato nella mia vita con il ruolo di Amico..ora hai cambiato ruolo, sei l'altra parte di me, la persona con cui spero di condividere la vita. Credo di non avere bisogno di dirti altro: siamo una cosa sola.

Spero che questi ringraziamenti siano da una parte un punto di arrivo, ma anche un punto di inizio, perché credo che non si finisca mai di crescere e spero di raggiungere nuovi importanti traguardi nella mia vita.